

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Direktor: Professor Dr. med. A. Kröncke
in der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Erlangen-Nürnberg

ZUR PH-ABHÄNGIGKEIT DES GLUKOSEABBAUS UND DER MILCHSÄUREBILDUNG ISOLIERTER PLAQUE-STREPTOKOKKEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Klaus Tischer
aus Bamberg

1979

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Direktor: Professor Dr. med. A. Kröncke
in der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkranke
der Universität Erlangen-Nürnberg

ZUR PH-ABHÄNGIGKEIT DES GLUKOSEABBAUS UND DER MILCHSÄUREBILDUNG ISOLIERTER PLAQUE-STREPTOKOKKEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Klaus Tischer
aus Bamberg

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. A. Kröncke

Tag der mündlichen Prüfung: 01.03.1979

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	2
II. Problemstellung	4
III. Literaturübersicht	5
IV. Material und Methode	17
A. Bakterien	17
1. Charakterisierung	17
2. Anzüchtung	18
B. Versuchsablauf	18
1. Aufbereitung der Bakterien	18
2. Versuchsansätze und Inkubation	19
3. Verwendete Chemikalien	20
4. Geräte	20
C. Enzymatische Analytik	21
1. Bestimmung der Glukosekonzentration	21
2. Bestimmung der Milchsäurekonzentration	21
D. Berechnung und Auswertung der Meßergebnisse	22
E. Vorversuche	24
1. Enzymtests	24
2. Puffersystem	25
3. pH-Verschiebung während der Versuche	25
4. Konstanz der Versuchsbedingungen	27
5. Aerobe Inkubation Stamm T3/67 im Brut- schrank	28
V. Ergebnisse und Diskussion	31
VI. Zusammenfassung	42
VII. Schrifttum	43
VIII. Anhang	

I. EINLEITUNG

Prozesse und Veränderungen mikrobiologischer und chemisch-physikalischer Natur in den Plaques besitzen entscheidende Bedeutung sowohl bei der Karies als auch bei der Parodontitis (GEHRING 1972). Diese beiden Krankheiten gelten als die wichtigsten Ursachen für den Zahnverlust und damit für die Beeinträchtigung der Kaufunktion. Hohe materielle Aufwendungen sind für die Behandlung der von ihnen verursachten Gebißschäden erforderlich.

Nachdem früher die Erforschung der eigentlichen Genese der Zahnkaries im Mittelpunkt der Bemühungen stand und dies inzwischen als in den Grundzügen abgeschlossen anzusehen ist, tritt seit dem zweiten Weltkrieg zunehmend das Bestreben in den Vordergrund, durch Erkennen der Ursachen von der überwiegend symptomatischen zu einer kausalen Behandlung, d.h. zu einer wirkungsvollen Prophylaxe zu kommen.

Die einfachsten Möglichkeiten zur Reduzierung der Karies bestehen in der Verbesserung der Mundhygiene und in der Reduzierung des Zuckerkonsums, vor allem zwischen den Mahlzeiten. Gerade eine Verminderung der in den Industrieländern immer noch steigenden Zuckeraufnahme wird nicht nur von den Kariologen, sondern auch von den Ernährungsforschern seit langem gefordert. Zum Beispiel konnte YUDKIN (1971) an Versuchstieren, deren Futter statt Stärke einen mehr oder weniger großen Anteil an Rohrzucker enthielt, neben verstärkter Zahnkaries auch andere Effekte beobachten wie eine Verminderung des Wachstums und der Lebenserwartung, verstärkte Körperfettbildung, Gewichtsanstieg von Leber und Niere sowie Nephrosen, Atherome, Gallensteine und anderes. Durch Aufklärung über die allgemeinen und die speziell die Zähne betreffenden Schäden als Folge zu hohen Kohlenhydratkonsums verbesserte sich das Gesundheitsbewußtsein der Bevölkerung auf diesem Gebiet ebenso wie in Teilbereichen der Allgemeinmedizin.

Nach den bisherigen, nicht sehr optimistisch stimmenden Erfahrungen mit individuell durchzuführenden Maßnahmen (verbesserte Mundhygiene, Reduzierung des Zuckerkonsums etc.) wird die zukünftige Entwicklung wohl zu der trotz guter Erfolge noch heiß diskutierten Kollektivprophylaxe fortschreiten müssen, sei es nun in Form der Trinkwasserfluoridierung nach natürlichem Vorbild (HAGAN et al. 1954; GEEVER et al. 1958; BROWN und POPLOVE 1965), sei es in Form einer Kochsalzfluoridierung oder ähnlicher Maßnahmen. Gerade diese Kollektivmaßnahmen, bei denen die individuelle Sorge des einzelnen für seine Gesundheit eingeschränkt wird, erfordern jedoch eine äußerst gewissenhafte Untermauerung durch vor- ausgehende Forschungen, mit denen sowohl der Nutzen als auch die gleichzeitige Unschädlichkeit eindeutig bewiesen werden muß.

Diese Untersuchungen konzentrieren sich in jüngerer Zeit zunehmend auf einzelne Aspekte des Stoffwechsels der Mikroorganismen.

II. PROBLEMSTELLUNG

Die Arbeiten über den Stoffwechsel des Speichels, der Plaques oder spezieller Keime wurden meist unter konstant gehaltenem pH durchgeführt, mit variierender Inkubationszeit, Substratmenge und -art, oder es wurden die pH-Veränderungen als Auswirkung und als Charakteristikum des Bakterienstoffwechsels gemessen. Abgesehen von körpereigenen Faktoren wird jedoch nicht nur das pH der Mundhöhle bzw. der Plaques durch den Stoffwechsel der Bakterien bestimmt, sondern es besteht umgekehrt auch eine Wirkung der vorhandenen Wasserstoffionenkonzentration auf die Aktivität der Bakterien. Schwankungen des pH der verschiedenen Mundhöhlenareale lassen es also interessant erscheinen, die Bedeutung des pH-Wertes für den Stoffwechsel der Bakterien herauszufinden. Mit diesem Problem befaßten sich bisher nur wenige Autoren.

In der vorliegenden Arbeit soll deshalb anhand des Glukoseverbrauchs und der Milchsäureproduktion folgendes untersucht werden:

- Inwieweit ein pH-Wert (oder -Bereich) festgestellt werden kann, bei dem bestimmte Streptokokkus mutans-Stämme maximale Stoffwechselaktivität zeigen.
- Wie sich der Stoffwechsel dieser Bakterien in den extremen pH-Bereichen verhält.

III. LITERATURÜBERSICHT

Aus der auch heute noch im Grundsatz anerkannten Theorie, die die Karies als einen chemisch-parasitären Prozeß darstellt (MILLER 1889), ergeben sich zwei wichtige Folgerungen, an denen die Arbeit der Kariesforschung ansetzen kann:

- Ohne Mikroorganismen kann keine Karies entstehen.
- Ohne Kohlenhydrate gibt es keine Karies. (KÖNIG 1971)

In reinem Speichel, der keine Bakterien enthält, findet kein Abbau von Glukose statt, wie KRÖNCKE (1959) zeigen konnte. Auch wurde völlige Karieslosigkeit bei gnotobiotischen Tieren nachgewiesen (ORLAND et al. 1954, 1955; ORLAND 1959; GUSTAVSON 1948; FITZGERALD und KEYES 1960), doch eine keimfreie Mundhöhle ist nicht denkbar. So mußte man sich auf den Versuch einer Verminderung der oralen Keimzahl beschränken. Neben der Keimverarmung durch entsprechende Mundhygiene (BIBBY 1965) kommen hier Substanzen in Frage, die das Wachstum und die Vermehrung der Keime hemmen. So ist es zum Beispiel HARDWICK (1961) gelungen, eine Kariesverminderung durch Fluoranreicherung in den Plaques zu erreichen, während in neueren Untersuchungen unter anderem Chlorhexidin als Hemmsubstanz verwendet wird (OCHSENBEIN 1974). Die Problematik bei der Anwendung solcher Methoden in vivo liegt jedoch darin, daß infolge einer selektiven Verminderung bestimmter Organismen unter Umständen andere überhand nehmen und dadurch das ausgewogene Gleichgewicht unter den Symbionten der Mundhöhle - die Eubakterie - gestört wird.

Den zweiten Ansatzpunkt der Kariesforschung bilden die Substrate, die für den kariogenen Stoffwechsel der Plaqueflora nötig sind, nämlich die Kohlenhydrate. BRAMSTEDT und TRAUTNER (1971) umreißen die Biochemie der Plaque durch folgende drei Prozesse:

- Bildung von extrazellulären Polysacchariden (EPS)
- Bildung von intrazellulären Polysacchariden (IPS)
- Säureproduktion aus niedermolekularen Kohlenhydraten.

Die EPS stellen dextranähnliche Kittsubstanzen dar, die zusammen mit Speichelkomponenten die Bakterien zu sehr fest auf der Zahnoberfläche haftenden Komplexen verbinden. Diese Anlagerungen erlauben durch Behinderung der Diffusion ein längeres Verweilen der beim Kohlenhydratabbau entstehenden Säuren. Außerdem werden mit zunehmender Dicke unter dann bestehenden anaeroben Verhältnissen die säurebildenden und damit kariogen wirkenden Mikroorganismen begünstigt. GEHRING (1972) hält die Fähigkeit zur Synthese von EPS für das auffälligste Merkmal kariogener Streptokokken. Allerdings scheint die Bildung der EPS nicht unbedingt eine direkte Stoffwechselleistung der Bakterienzelle zu sein, da - unter Hydrolyse der sehr energiereichen Saccharosebindung - eine Polysaccharidbildung auch durch extrazelluläre Transferasen möglich ist (KÖNIG 1971).

Die IPS - nach Angaben von HAHN et al. (1970) machen sie bis 50 % des Trockengewichtes der Zellen aus - bilden eine Energiereserve, die in Ruhezeiten abgebaut werden kann (RANKE und RANKE 1970; GEHRING 1972). In vivo ist dies z.B. nachts der Fall, wenn die Pufferung im Mundhöhlenmilieu herabgesetzt ist und dadurch eine langdauernde Säureproduktion in den Plaques nicht ausgeglichen wird. JORDAN (1965) fand eine quantitative Umwandlung von IPS zu Milchsäure bei Abwesenheit exogener Energiequellen. Es scheint kennzeichnend zu sein, daß bei kariogenen Streptokokken die IPS-Bildung (BRAMSTEDT F. 1971) bzw. bei kariesanfälligen Probanden die Anzahl der IPS-bildenden Mikroorganismen (GIBBONS und SOKRANSKY 1962) erhöht sind.

Die eigentliche Noxe jedoch, die bei längerdauernder Einwirkung über eine Entmineralisierung zum kariösen Einbruch in die Zahnhartsubstanz führt, stellt die Säurebildung der Keime dar. Nach Ansicht von LAMMERS und HAFER (1956) ist der Zahn mechanischen und bakteriellen Angriffen gegenüber sehr gut geschützt, gegen Säuren dagegen wehrlos. Der Zusammenhang zwischen Kohlenhydratverbrauch und Säuregehalt der Plaques wurde von mehreren Autoren nachgewiesen

(u.a. FROSTELL 1969). Wie schnell und in welchem Ausmaß sich die Wasserstoffionenkonzentration verändert, wenn die Plaque Zucker aufnimmt, konnte schon STEPHAN (1940) zeigen. Innerhalb weniger Minuten und für einen Zeitraum von 30 bis 60 Minuten fällt das pH vom normalen Wert, der bei etwa 6,8 liegt (FROSTELL 1974), auf unter 5,0, wodurch die kritische Grenze von 5,4 für die Schmelzauflösung (JENKINS 1974) längere Zeit unterschritten werden kann. Wenn die Pufferung durch den Speichel und durch in den Plaques enthaltene Stoffe, wie etwa die Proteine der Matrix oder möglicherweise auch der Bakterien selbst, erschöpft ist, ist die Zahnhartsubstanz dieser Säureeinwirkung ausgesetzt. Eine entsprechend positive Korrelation zwischen Plaque - pH und Karies zeigten sehr eindrucksvoll KLEINBERG und JENKINS (1964). Sie fanden beim pH der Plaques von den verschiedenen Zahnflächen ein ähnliches Verteilungsmuster wie bei den kariös veränderten Arealen.

Die überwiegend anaeroben Verhältnisse in den Plaques erlauben nur eine Vergärung der Kohlenhydrate. Als für die kariöse Zerstörung wichtigstes Produkt des auf dem Embden-Meyerhof-Weg abgebauten Zuckers (DALLMEIER 1970) stand die Milchsäure im Vordergrund (RANKE et al. 1969, 1976; MOLL 1970), doch wiesen FOSDICK (1952) und MATHIS (1947) schon früh auf die Möglichkeit hin, daß auch andere saure Intermediärprodukte wichtig sein könnten. Wiederholt wurde versucht, eine Verbindung zwischen der Laktatproduktion und der Kariogenität der Bakterien nachzuweisen. Während E. u. B. RANKE (1970) wie auch JORDAN (1965) bei mehr oder weniger kariesaktiven Streptokokken etwa gleich große Mengen fanden, sprechen andere Autoren von deutlich erhöhter Milchsäurebildung bei kariesaktiveren Keimen (HAHN et al. 1973; BRAMSTEDT et al. 1971).

In den oft sehr dick aufwachsenden Plaques wie auch in der kariösen Läsion herrschen nur in den oberen Schichten aerobe, mit dem Speichel vergleichbare Verhältnisse. Tiefere Regionen weisen zunehmend anaerobe Bedingungen auf, was sich in

der bakteriellen Zusammensetzung widerspiegelt (HARDIE 1974; MÜHLEMANN 1976; SAUERWEIN 1974). Bei den meisten Untersuchungen wurden besonders in den tieferen Lagen als häufigste Bakterienart die Streptokokken gefunden, die nicht nur wegen ihrer Zahl, sondern auch wegen ihrer speziellen Eigenschaften in den Zahnbelägen eine dominierende Rolle spielen (SAUERWEIN 1974; RANKE B. und F. 1970). Diese quantitative und qualitative Bedeutung spiegelt sich wider in der Zahl der Arbeiten, die versuchen, die Bedeutung der Streptokokken und ihrer Stoffwechselmechanismen in der Kariesgenese herauszufinden.

Wegen seiner besonders engen Beziehung zur Kariesentstehung wurde vor allem der Abbau der einzelnen Kohlenhydrate aus der Nahrung mittels vielfältiger Methoden und unter ganz verschiedenen Aspekten untersucht (RANKE et al. 1964; MILLER et al. 1940; STRÅLFORS 1948; FROSTELL 1960, 1962, 1964; MESCHÉDE 1969; TANZER et al. 1969). Einige Abhandlungen, die im Hinblick auf die Thematik der vorliegenden Arbeit von Interesse sind, seien hier in den Grundzügen geschildert, wobei teilweise nur spezielle Gesichtspunkte der Versuchsergebnisse herausgegriffen werden. Besondere Beachtung fanden das Produktspektrum des Streptokokkenstoffwechsels, die IPS-Synthese und der pH-Einfluß auf die Keime.

NEUWIRTH und SUMMERSON (1951) untersuchten unter physiologischen (aeroben) Bedingungen die Säureproduktion der Mikroorganismen im Speichel, der außer den zahlenmäßig dominierenden Streptokokken auch eine Vielzahl anderer Keime enthält. Unter diesen Voraussetzungen waren im Durchschnitt 37,8 % der insgesamt entstandenen Säuremenge als Lactat nachzuweisen, während 21,4 % als Pyruvat vorlagen. Die Autoren beschäftigten sich auch mit dem zeitlichen Ablauf der Produktion dieser beiden Säuren. Sie stellten eine Milchsäurebildung sofort nach der Glukosezugabe fest, dagegen war Pyruvat erst mit Verzögerung nachweisbar. In mehreren Versuchen mit Zugabe von nur wenig Glukose, die bereits innerhalb etwa 30 min. verbraucht war, fanden sie nach Ablauf dieser Zeit

ein Maximum an Milchsäure, danach sinkende Milchsäure-Werte. Dies läßt auf eine Weiterverwertung schließen. Die Werte für Pyruvat zeigten ebenfalls einen steilen Anstieg während der ersten halben Stunde, stiegen jedoch auch danach noch weiter an.

JORDAN (1965) analysierte die Endprodukte des Glukosestoffwechsels an Ratten-Streptokokken. Bei einem Verbrauch von 44,2 % der eingebrachten Glukose fand er folgende Stoffe:

Lactat	181,1 mMol pro 100 mMol umgesetzter Glukose
Acetat	9,2 "
CO ₂	8,3 "
Äthanol	2,8 "
Formiat	3,4 "
Acetoin	0,6 "
Diacetyl	0,01 "

Diese mit einem kariesaktiven Streptokokkenstamm gefundenen Werte unterscheiden sich nur geringfügig von denen eines als kariesinaktiv bekannten, was den Autor zu der Vermutung veranlaßt, daß die Säurebildung nicht die alleinige Ursache der Kariogenität von Bakterien ist, sondern daß noch andere, in seinen Versuchen nicht faßbare Faktoren mitspielen. Bei einer anaeroben Inkubation mit einem kariesaktiven Stamm ergab sich ein Verhältnis Lactat/Glukose wie 1/2,04, also rechnerisch ein über 100 %iger Umsatz der Glukose zu Milchsäure. Hier wurden offensichtlich von den Keimen auch zelleigene Reserven in den Stoffwechsel eingebracht.

Ein ähnliches Substanzspektrum bei der Fermentation von Glukose durch Plaquestreptokokken fanden DALLMEIER, BESTMANN und KRÖNCKE (1970). Bei den Inkubationen, die genauso durchgeführt wurden wie in unseren Versuchen, entwickelte z.B. der auch von uns verwendete Stamm 249 aus Glukose 88 Mol% Milchsäure, 8,5 Mol% Essigsäure und 3,6 Mol% Ameisensäure. Dagegen entstanden beim Hexitabbau (Sorbit und Mannit) wesentlich mehr Ameisensäure und Äthanol auf Kosten der Milchsäure. Solche Befunde sind besonders im Hinblick auf die

Eignung bestimmter Substanzen als Zuckeraustauschstoffe von Bedeutung.

Mit manometrischer Methode und enzymatischen Nachweisen bestimmte MOLL (1970) den Glukoseabbau und die Milchsäurebildung isolierter Plaquestreptokokken. Er fand in Bezug auf die Menge der verbrauchten Glukose und die benötigte Zeit relativ große Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen. In seinen Versuchen wurde die Glukose zu 80 - 90 % in Milchsäure umgewandelt, die nicht weiter metabolisiert wurde. Die von ihm ermittelte Anfangskonzentration der Glukose lag um etwa 10 % über der zugeführten Menge, was er mit der Spaltung intrazellulärer Polysaccharide erklärt.

Mit diesen Energiereserven der Bakterien befaßten sich neben anderen Autoren auch FREEDMAN und COYKENDALL (1975). Sie stellten bei 22 geprüften Streptokokkus mutans-Stämmen große Unterschiede der Synthese von IPS fest (gemessen als Jod- und GOD-positives Material in Zellhydrolysaten); ebenso unterschied sich die Säurebildung. Die Bildung von IPS nahm von einer bestimmten Glukosekonzentration im Nährmedium (0,2 - 0,5 %) ab sprunghaft zu. Die Metabolisierung dieser Reservestoffe zu Säure war gewöhnlich nach einer Stunde beendet. Stämme, die bei Glukosekonzentrationen von über 0,2 % ansehnliche Mengen IPS synthetisierten, erniedrigten ihre Vorräte rapide, solange ein günstiges äußeres pH (über 4,5) aufrechterhalten wurde. Die Autoren ziehen aus ihren Versuchen den Schluß, daß die IPS-Synthese der Streptokokken vor allem durch die äußere Kohlenhydratkonzentration, der IPS-Verbrauch dagegen zumindest anfänglich vom extrazellulären pH beeinflußt wird. Die Tatsache, daß ein als kariogen bekannter Stamm im Vergleich zu den anderen wenig IPS synthetisierte, läßt sie in Frage stellen, ob die Größe der IPS-Bildung in direkten Zusammenhang mit der Kariogenität der Bakterien gebracht werden kann, wie es verschiedene Autoren, z.B. BRAMSTEDT und TRAUTNER (1971) und GIBBONS und SOCRANSKY (1962) für sehr wahrscheinlich halten. Anderen Berichten zufolge (RANKE und RANKE 1970) findet sich eine IPS-Bildung sogar häufiger bei kariesinaktiven Stämmen.

Schon früh wurde erkannt, daß die Stoffwechselreaktionen der Bakterien wie fast alle chemischen Reaktionen von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig sind. Allgemein findet man die Aktivität proteolytischer Keime mehr im alkalischen, die der Kohlenhydrate vergärenden Keime mehr im sauren Bereich. Nach LAMMERS und HAFFER (1956) liegt das pH-Optimum der Streptokokken bei 6,0 - 7,2. SAUERWEIN (1974) gibt als optimalen pH-Bereich für dieselben Keime 5,4 - 7,0 an.

In den letzten Jahren wurden von verschiedenen Autoren jeweils bestimmte Aspekte des Streptokokkenstoffwechsels bei variierendem pH untersucht:

Den Einfluß des pH auf Synthese und Abbau von IPS durch *Streptococcus mutans* beobachteten de STOPPELAAR und van DAMME (1977) anhand der Bildung von Polysaccharid-Jod-Komplexen (Abb.1).

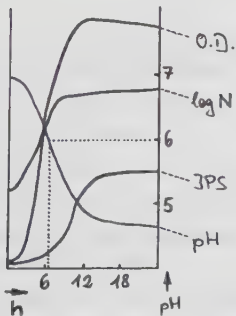


Abb. 1:

BEZIEHUNG ZWISCHEN OPTISCHER
DICHTE, ZELLZAHL, IPS-BILDUNG
UND PH SOWIE IHR ZEITLICHER
VERLAUF

(*Streptococcus mutans*)
(aus: de STOPPELAAR und
van DAMME 1977)

Diese Ergebnisse verglichen sie mit anderen Streptokokkenarten. Die Synthese von nennenswerten Mengen an IPS begann bei *Streptococcus mutans* etwa zu dem Zeitpunkt, an dem das Ende der logarithmischen Wachstumsphase erreicht und das pH unter 6 gefallen war, während sie z.B. bei *Streptococcus mitior* sofort einsetzte. In standardisierten, ruhenden Zellsuspensionen synthetisierte *Streptococcus mutans* IPS bevorzugt bei pH-Werten zwischen 5 und 6, während über 7 und unter

4,5 die Bildung dieser Reservestoffe gering war. Streptokokkus mitior und Streptokokkus milleri hatten ihr entsprechendes pH-Optimum etwa am Neutralpunkt. Der IPS-Abbau aller geprüften Streptokokken war bei pH 7 am größten und wurde bei tieferen pH-Werten zunehmend geringer. Abschließend vertraten die Autoren die Meinung, daß in Plaques, in denen das pH bei Zuckerzufuhr sofort abfällt, Streptokokkus mutans gegenüber anderen Bakterien in der IPS-Synthese begünstigt sein dürfte und daß die gespeicherten IPS zu Säure abgebaut werden, wenn das pH, nachdem die exogene Kohlenhydratzufuhr erschöpft ist, wieder steigt.

FUTAKAMI, SATO und IWAMI (1976) verglichen nach anaerober Inkubation die Milchsäurebildung des Streptokokkus mutans-Stammes PK 1, einer Variante davon und des Streptokokkus sanguis Stammes NCTC 10904 (Abb. 2)

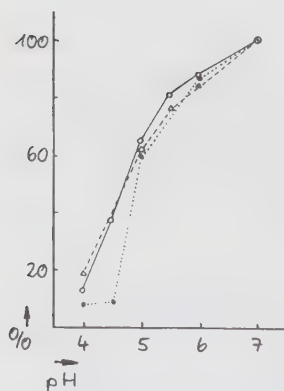


Abb. 2:

RELATIVE LAKTATBILDUNG

BEI UNTERSCHIEDLICHEM PH

- Streptococcus mutans PK1
- - -▲- Variante von Strept. mutans PK1
-●..... Streptococcus sanguis NCTC 10904

(aus: FUTAKAMI, SATO und IWAMI 1976)

Letzterer konnte bei pH 4,0 und 4,5 deutlich weniger Milchsäure produzieren als die beiden erstgenannten Stämme.

Die von ihnen zitierten HIGUCHI et al. (1976) stellten beim Vergleich zwischen Streptokokkus mutans und sanguis eine ähnliche Tendenz fest. Interessant ist bei FUTAKAMI et al. die relative Größe der Lactatproduktion bei den niedrigen

pH-Werten im Vergleich zum Neutralpunkt. Sie sank bei pH 6 auf 80 bis 85 %, bei pH 5 auf 60 - 65 % und bei pH 4 schließlich auf 8 - 20 %.

GRIFFITH und MELVILLE (1974) untersuchten das Wachstum von Mundstreptokokken anaerob in einem Chemostaten bei variierendem pH, wobei sie als Meßgröße die optische Dichte der Inkubationslösungen verwendeten. Geprüft wurden zwei Streptokokkus mutans Stämme (D 282, JC 2) und ein Stamm von Streptokokkus faecalis (Abb. 3)

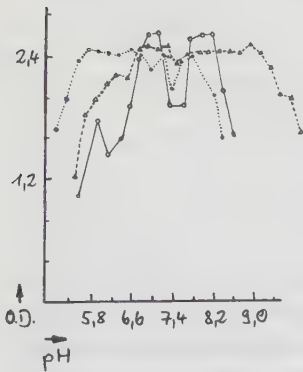


Abb. 3:

OPTISCHE DICHTENACH DER INKUBATION
BEI UNTERSCHIEDLICHEM PH

- Streptococcus mutans D282
- Streptococcus mutans JC2
- ▲••▲ Streptococcus faecalis

(aus: GRIFFITH und MELVILLE 1974)

Alle 3 Stämme zeigten reduziertes Wachstum im sauren und alkalischen Bereich. Der von anderen Autoren als stark kariogen erkannte Stamm D 282 wuchs jedoch bei niedrigem pH noch wesentlich besser als die beiden anderen Stämme, die als wenig kariogen bezeichnet wurden. Dies fällt besonders auf, wenn man die Werte bei pH 5,5, der Grenze für die Schmelzentkalkung, vergleicht. Ein ebenso interessanter Befund ist der schwer erklärbare Rückgang der optischen Dichte aller drei Kulturen bei pH 7,3 - 7,4 mit nachfolgendem Wiederanstieg. Die Autoren vermuten, daß in diesem pH-Bereich eine Änderung in der Glukoseverwertung eintritt, nämlich ein Wechsel in der Menge der für Energie oder für Assimilation in Zellsubstanzen verbrauchten Glukose.

EGOROV et al. (1976) stellten den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf den Stoffwechsel von *Streptococcus lactis* dar, und zwar anhand der innerhalb einer bestimmten Zeit im Chemostaten bei dem jeweiligen pH-Wert entstandenen Bakterienmengen ("Biomasse" in mg/l) und der Menge des von den Keimen synthetisierten Antibiotikums Nisin (Abb. 4).

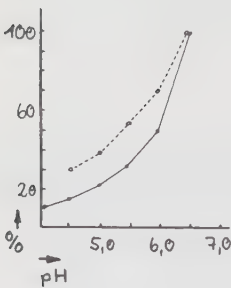


Abb. 4:

BIOMASSE (●—●) UND NISINPRODUKTION
(○---○) BEI UNTERSCHIEDLICHEM PH

(Bezogen auf Kontrollansätze mit pH 6,6)
(*Streptococcus lactis*)

(aus: EGOROV et al. 1976)

Die Meßwerte wurden prozentual auf Kontrollansätze bei pH 6,6 bezogen. Auch bei diesen Meßgrößen zeigte sich ein kontinuierliches Absinken der Stoffwechselleistungen und des Wachstums der Keime mit steigender Azidität. Ergänzenden Angaben der Autoren zufolge blieb bei früheren Versuchen das Wachstum von pH 6,6 bis etwa 9,0 stabil.

Den Effekt verschiedener Kationen und wechselnder Wasserstoffionenkonzentration auf die bakterielle Aggregation beobachteten BELCOURT et al. (1974). Sie inkubierten *Streptococcus mutans* OMZ 175 und *Actinomyces viscosus* X 1. Die sich entwickelnden Aggregate werden sedimentiert, die optische Dichte gemessen und daraus der Prozentsatz der Aggregation berechnet (Abb. 5). Unterhalb pH 4 trat bei *Streptococcus mutans* eine mäßige, oberhalb des Neutralpunktes eine starke Aggregation auf, während zwischen pH 4 und 7, was in etwa dem im Mund vorhandenen pH-Bereich entspricht, keine nennenswerte Zusammenballung stattfand.

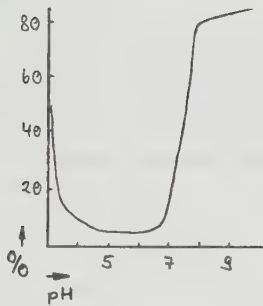


Abb. 5:

AGGREGATION DER ZELLEN
BEI UNTERSCHIEDLICHEM PH

(*Streptococcus mutans* OMZ 175)

(aus: BELCOURT et al. 1974)

Eine ganz andere Methode, den pH-Einfluß auf die Bakterien zu erforschen, wandten TYTGAT et al. (1975) an. Sie maßen nicht bestimmte Stoffwechselgrößen, wie die meisten anderen Autoren in ihren Untersuchungen, sondern direkt den schädigenden Einfluß bestimmter Wasserstoffionenkonzentrationen auf die Zellen. Zwar wurden die Versuche mit Bakterien angestellt, die im Munde nicht bzw. nur in geringer Zahl vorhanden sind (*Neisseria perflava*, *Moraxella* u.a.), doch erscheinen die Ergebnisse interessant genug, um kurz geschildert zu werden. Die Autoren setzten das gewaschene Zentrifugat von Inkubationslösungen 30 min. lang verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen aus und bestimmten anschließend die optische Dichte und damit die prozentuelle Auflösung der Bakterienzellen. Abb. 6 zeigt als Beispiel das Ergebnis für *Proteus* P 18, welches analog auch für die anderen Keime gilt. Im Bereich pH 6 bis 8,5 trat wenig Änderung ein, dagegen war bei extremem, vor allem bei basischem pH die Lyse der Zellen sehr eindrucksvoll. Über pH 10 erfolgte schon nach 20 min. Kontakt vollständige Auflösung.

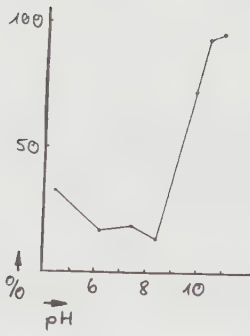


Abb. 6:

AUFLÖSUNG DER ZELLEN
BEI UNTERSCHIEDLICHEM PH

(aus: TYTGAT et al. 1975)

IV. MATERIAL UND METHODE

A. BAKTERIEN

1) Charakterisierung

Allgemeine Einteilungen der Bakterien, die mehr oder weniger alle auf BERGEY (1964) fußen, sind bei HABS und SELIGER (1967), SCHLEGEL (1967), HOFFMANN-AXTHEIM (1974) und anderen Autoren zu finden. Einen Überblick über die Mikroorganismen der Mundhöhle mit ihren wichtigsten Charakteristika und fermentativen Eigenschaften geben SAUERWEIN (1974) und HARDIE (1974).

Für die vorliegende Untersuchung standen Reinkulturen von 11 Streptokokkus mutans-Stämmen zur Verfügung (siehe Tabelle 1). Es handelt sich um grampositive, fakultativ anaerob wachsende Mikroorganismen.

Tab. 1:

Art: Streptokokkus mutans

Stamm	Serolog. Eingruppierung	Herkunft
C2/21	"Sero"-Biotyp a	Prof. Gehring, Mikrobiologe am Lehrstuhl für experimentelle Zahnmedizin der Universität Würzburg, Sonderforschungsbereich Biologie der Mundhöhle
T3/52	b	
T3/53	c	
T5/13	d	
T3/67	e	
441	Serotyp c	
	≅ NCTC 10449	
626	a	
634	b	
638	e	
249	serolog. nicht eingruppierbar	Department of Preventive Dentistry, Laboratory of Microbiology, University of Utrecht Prof. de Stoppelaar
C67/1	sehr ähnlich NCTC 10449	

[†]Literatur zu den TURKU-Stämmen:
GEHRING et al. 1974

2) Anzüchtung

Die Streptokokken lagen als Stichkulturen in Thioglykolatnährböden vor, von denen sie zur Anzüchtung auf Blutagarplatten übertragen wurden. Diese wurden im Brutschrank bei 37 ° C 24 Stunden im Gaspaktopf unter anaeroben Bedingungen bebrütet und anschließend im Kühlschrank bei 4 ° C aufbewahrt.

Die Nährlösung zur Anzüchtung der Bakterien setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen:

20	g	Bacto Tryptose
4	g	Hefe Extrakt
2,5	g	Kochsalz
50	mg	L-Cystin
2,5	g	Dinatriumhydrogenphosphat
0,6	g	Natriumdihydrogenphosphat
10	g	Glukose

Die angegebenen Mengen wurden im Erlenmeyer-Kolben eingewogen, mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt, auf dem Magnetrührgerät 20 min. bei ca. 80 ° C gelöst und schließlich im Autoklaven sterilisiert (15 min. bei 120 ° C und 1 atü). Um für die Inkubation genügend Keime zur Verfügung zu haben, erwies es sich als nötig, die Bakterien zuerst in 10 ml Schraubreagenzgläser zu überimpfen. Diese Vorkulturen wurden nach 4 Stunden in Gefäße mit 0,7 l Nährlösung überführt, wo die Bakterien nun bis Versuchsbeginn 15 Std. bei 37 ° C im Brutschrank anwachsen konnten.

B. VERSUCHSABLAUF

1) Aufbereitung der Bakterien

Die im flüssigen Nährmedium angezüchteten Bakterien wurden 10 min. bei 4000 U/min. zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurde der verbleibende Bodensatz zweimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, jeweils wiederum abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das gewaschene Sediment konnte nun in physiologischer Kochsalz-

lösung photometrisch bei 620 nm auf eine Transmission von 0,1 eingestellt werden (gegen Leerwert NaCl). Zwischenzeitliches Rühren auf dem Magnetrührgerät ergab eine hinreichend homogene Suspension und damit etwa gleiche Keimzahl in allen Ansätzen. Bei zwei Stichproben mit gram-gefärbten Präparaten der Stämme 441 und C67/1 erwies sich die Homogenisierung lichtmikroskopisch als ausreichend.

2) Versuchsansätze und Inkubation

Die Inkubation erfolgte in dem von OTTO WARBURG 1926 entwickelten und nach ihm benannten Gerät (KOELLE; UMBREIT et al. 1964), das ein gleichzeitiges Arbeiten mit 14 Ansätzen ermöglichte. Die von WARBURG angegebene manometrische Methode - basierend auf der Messung von Druckänderungen, die sich beim Stoffwechsel der Mikroorganismen in einem geschlossenen System ergeben - konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da der zur CO₂-Freisetzung nötige Bikarbonatpuffer nicht auf die gewünschte Spannweite der pH-Werte einstellbar ist.

Das Flüssigkeitsvolumen in den Reaktionsgefäßen betrug bei allen Versuchen 10 ml ("große" Warburggefäße). Folgende Substanzen wurden einpipettiert:

- 5 ml Britton und Robinson-Puffer in den durch Mischen der Stammlösungen a und b (siehe unten) erhaltenen pH-Stufen 4,0 - 4,6 - 5,2 ... - 11,8
- 1 ml Glukose-Lösung 1/25 m = 40 μ Mol Glukose
- 4 ml Bakteriensuspension mit T=0,1

Durch die Verdünnung der Glukose-Lösung mit Puffer und Bakteriensuspension ergab sich - bezogen auf den Gesamtansatz - eine Glukosemolarität von 1/250.

Die 14 verschiedenen Versuchsansätze wurden, an die Manometer angeschlossen, in das Wasserbad (37 ° C) eingehängt und mit einer Frequenz von 110/min. geschüttelt. Zehnminütiges Begasen mit einem Gemisch aus 95 % N₂ und 5 % CO₂ stellte im Reaktionssystem eine anaerobe Atmosphäre her. Nach 140

bis 170 min. Inkubationszeit wurden die Ansätze in Reagenzgläser umgefüllt und ihr pH-Wert gemessen und protokolliert. Anschließendes Zentrifugieren (20 min. bei 4000 U/min.) trennte die Keime von der Flüssigkeit. In Proben dieser bakterienfreien Inkubationslösung wurden enzymatisch die Mengen der nicht verbrauchten Glukose und der gebildeten Milchsäure bestimmt.

3) Verwendete Chemikalien

Stichkulturen: Thioglykolat-Nährboden Merck Art. 8191
 Blutagarplatten: Firma Biotest
 Flüssigkulturen: Bacto Tryptose Difco 0124-01
 Hefeextrakt Difco 0127-01
 Kochsalz Merck Art. 6404
 L-Cystin Difco 0184-15
 Dinatriumhydrogenphosphat Merck Art. 6580
 Natriumdihydrogenphosphat Merck Art. 6346
 Glukose Merck Art. 8342
 Stammlösungen für Britton und Robinson-Puffer:
 a) 0,2 Mol Phosphorsäure/l
 0,2 Mol Essigsäure/l
 0,2 Mol Borsäure/l
 b) 1 n Natriumhydroxid
 Substrat: Glukose Merck Art. 8342
 Enzymtests: Test-Kombination Glukose
 Boehringer Diagnostika Best.Nr. 124028
 L-Milchsäure UV-Test
 Boehringer Lebensmitteldiagnostik
 Best.Nr. 138084

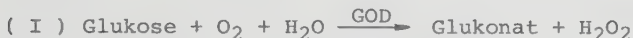
4) Geräte

Warburg-Apparat V 166 B. Braun Melsungen
 Photometer PMQ II mit Filter M 4 Q III Carl Zeiss
 Eppendorf Photometer 6120
 Digital pH-Meter model 701 Orion Research
 Digitale Analysenwaage 2400 Sartorius
 Minifuge Haereus Christ
 Gas Pak-System Becton, Dickinson and Company

C. ENZYMATISCHE ANALYTIK

1) Bestimmung der Glukosekonzentration

Der Glukosenachweis erfolgte mit der Boehringer "Test Combination Glukose", nach der GOD-Perid-Methode. Die Glukose wird durch Glukoseoxidase (GOD) in Gegenwart von Sauerstoff und Wasser zu Glukonat oxidiert, der Sauerstoff zu H_2O_2 reduziert:



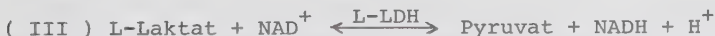
Das in stöchiometrischem Verhältnis entstehende Wasserstoff-superoxid läßt sich mit dem Redoxindikator ABTS und Peroxidase (POD) in einen Farbstoff überführen:



Dieser kann photometrisch bestimmt werden und stellt damit ein direktes Maß für die zu bestimmende Glukosemenge dar. (Genaue Beschreibung bei WIELINGER 1970)

2) Bestimmung der Milchsäurekonzentration

Die bei der Inkubation entstandene Milchsäure wurde mit dem Boehringer "UV-Test zur Bestimmung von L-Milchsäure in Lebensmitteln" nachgewiesen. Hierbei wird Milchsäure durch Nicotinamid (NAD) in Gegenwart von Laktatdehydrogenase (LDH) zu Pyruvat oxidiert:



Durch Abfangen der Brenztraubensäure läßt sich das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite von Pyruvat und NADH verschieben:



Die gebildete NADH-Menge ist der Milchsäure-Menge äquivalent und kann aufgrund der Absorption von NADH bei 334 nm als Meßgröße im Photometer bestimmt werden (BERGMEYER 1962).

D. BERECHNUNG UND AUSWERTUNG DER MESSERGEBNISSE

Für die Auswertung wurden folgende zusammenfassende Begriffe verwendet:

pH-Optimum: der pH-Wert, bei dem der Stoffwechsel, d.h. die Aktivität der Bakterien am größten war, gemessen am Glukoseverbrauch und an der Milchsäurebildung.

Umsetzungsgrad Glukose zu Milchsäure: Hier wurde angegeben, wieviel Prozent der verbrauchten Glukose als Milchsäure wiedergefunden wurden (im betreffenden Ansatz verbrauchte Glukose $\hat{=}$ 100 %).

Glukosefreisetzung: Im oberen und unteren pH-Bereich wurde oft nach dem Versuch mehr Glukose gefunden, als vorher einpipettiert worden war. Die hierfür gewählte Bezeichnung Glukosefreisetzung ist in der Diskussion der Versuchsergebnisse näher begründet.

Stoffwechselbereich: Es wurden pH-Bereiche definiert, in denen - bezogen auf den maximalen Glukoseverbrauch des betreffenden Durchgangs - mehr als 50 % des Stoffwechsels erreicht wurden. Diese Werte legen wir als Maß für die "pH-Toleranz" der Bakterien zugrunde.

Aktivitätskurven: Die nach der Inkubation noch vorhandene Glukosemenge und die entstandene Milchsäure wurden gegen den nach dem Versuch vorliegenden pH-Wert der einzelnen Ansätze aufgetragen.

Mit jedem der 11 Streptokokkenstämme wurden mindestens 2, meistens jedoch 4 - 5 Inkubationen (= "Durchgänge") durchgeführt. Beabsichtigt war, für jeden Stamm 2 vollständige, d.h. 14 pH-Stufen umfassende Durchgänge mit eindeutigen Ergebnissen für die Auswertung zur Verfügung zu haben. Bei einigen Stämmen dienten "Teildurchgänge" mit 6 - 8 Ansätzen zur genaueren Festlegung des pH-Optimums. Für diese konnten,

da sie nur einen Teil des pH-Bereiches von 4 bis 11,8 umfaßten, nur der jeweils gefundene größte Glukoseumsatz und die größte Milchsäurebildung angegeben werden, nicht jedoch ein 50 % Stoffwechselbereich oder eine Glukosefreisetzung. (Vergleiche hierzu: pH-abhängige Aktivitätskurven im Anhang)

Etwa 1/3 der durchgeführten Versuche konnte nicht ausgewertet werden, da die Kurve der Meßwerte eine Festlegung des maximalen Glukoseumsatzes bei einem bestimmten pH-Wert nicht erlaubte. Grund dafür war die sowohl zwischen den einzelnen Stämmen, als auch bei demselben Stamm von Tag zu Tag stark differierende Umsatzgeschwindigkeit. Es stellte sich erst nach Durchführung der Enzymtests heraus, ob die gewählte Inkubationsdauer zu einem verwertbaren Ergebnis führte. Bei insgesamt langsamem Umsatz resultierte eine flache Kurve der Meßwerte, die kein deutliches Maximum zeigte und deren niedrige Werte von Meßfehlern besonders stark beeinflusst sein konnten. Dagegen war bei schnellem und dann in mehreren Ansätzen vollständigem Umsatz der eingebrachten Glukose kein Substrat und folglich kein maximaler Verbrauch mehr nachweisbar.

Den Auswertungen wurde der zu Versuchsende vorhandene pH-Wert zugrunde gelegt, da aufgrund der Vorversuche (siehe dort) angenommen werden konnte, daß der Stoffwechsel der Bakterien überwiegend beim End-pH erfolgte.

Der Stoffwechsel der Streptokokken verläuft homofermentativ, d.h. es können theoretisch aus 1 Mol Glukose 2 Mol Milchsäure entstehen (HAHN et al. 1970). Aus diesem Grund wurde in den pH-abhängigen Aktivitätskurven der einzelnen Stämme (s. Anhang) für die Auftragung der Milchsäure der Glukosemaßstab halbiert, so daß auch hier ein 1 μ Mol Glukose 2 μ Mol Milchsäure gegenüber stehen.

Die zentrifugierten Inkubationsansätze enthielten die zu bestimmende Glukose bzw. Milchsäure in Konzentrationen, die ohne weitere Verdünnung im Meßbereich der enzymatischen Tests lagen. Im Anhang sind als Beispiel für die Berechnung

und Auswertung der Ergebnisse die Versuchsprotokolle des 1. Durchgangs Stamm 638 wiedergegeben (Tab. 2 und 3). Da in vielen Ansätzen des unteren und oberen pH-Bereiches nach dem Versuch mehr Glukose gefunden wurde als vorher einpipetiert worden war (vgl. Tab. 3: Spalte 4, Ansätze 12,13,14), ergaben sich bei der Berechnung der Spalten 5, 7 und 8 teilweise widersprüchlich scheinende Werte. Diese wurden deshalb in Spalte 5 und 7 mit "-" gekennzeichnet. Die Berechnung des Prozentsatzes, zu dem die verbrauchte Glukose (Spalte 7; $\hat{=}$ 100 %) als gebildete Milchsäure wiedergefunden wurde (Umsetzungsgrad Glukose zu Milchsäure; Spalte 8), erwies sich für die Auswertung nur bei den Ansätzen als brauchbar, bei denen mehr als ungefähr 10 % der 40 μ Mol Glukose umgesetzt worden waren. Bei niedrigerem Umsatz waren die Ergebnisse durch die relative Größe methodischer Meßfehler nicht verwertbar (siehe Kap. E 1 und Diskussion). Sie waren auch in den Fällen nicht sinnvoll zu berechnen, in denen statt Glukoseverbrauch scheinbar Glukose gebildet worden war. Solche Werte wurden deshalb im Versuchsprotokoll nicht berücksichtigt.

E. VORVERSUCHE

Eine Reihe von zusätzlichen Versuchen diente zum einen der Auffindung günstiger Bedingungen für die Hauptversuche, zum anderen der Abklärung bestimmter Randbedingungen.

1) Enzymtests

Um in etwa einen Überblick über die in den enzymatischen Tests zu erwartenden Fehlergrößen zu gewinnen, wurden mehrmals Bestimmungen von Glukoselösungen bekannter Konzentrationen durchgeführt. Bei insgesamt 17 Proben ergab sich, daß bei den 10 ml-Ansätzen mit einer Fehlerbreite von etwa $\pm$ 3,5 % gerechnet werden muß (siehe Tab. 4 im Anhang). Dies liegt noch unter dem allgemein akzeptierten Wert von 10 % für biologische Experimente.

Auf Überprüfung des Milchsäuretests wurde verzichtet, da die Milchsäure abhängig von der Konzentration in komplizierten Mischungen von intermolekularen Estern und Lactiden vorliegt (MOLTEN 1971). Als Faustregel wird hier allgemein mit bis zu 15 % Fehler gerechnet. Da jedoch die ermittelten Kurven keine größeren Unregelmäßigkeiten aufweisen, ist anzunehmen, daß keine großen, einzelne Ansätze betreffende Fehler aufgetreten sind.

2) Puffersystem

Für die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit mußte ein Puffersystem gefunden werden, das zwei Forderungen gleichzeitig erfüllte:

- Es sollte auf eine möglichst weite Spanne von pH-Werten einstellbar sein.
- Bei allen eingestellten pH-Werten sollte eine genügende Kapazität vorhanden sein, um die maximal mögliche Milchsäureproduktion von 2 Mol pro 1 Mol vorhandener Glukose abpuffern zu können.

In verschiedenen Konzentrationen wurden mehrere bei RAUEN (1964) angegebene Puffersysteme erprobt. Als für die Versuche am besten geeignet erwies sich schließlich der Britton und Robinson-Puffer in 5-facher Konzentration, der beide Forderungen erfüllte. Dies ließ sich durch Titration mit Milchsäure nachweisen: Zu jeweils 1,25 ml Pufferlösung von eingestelltem pH 4,0, 7,0 und 10,0 wurde schrittweise 1 μ Mol Milchsäure zugegeben und die pH-Änderung gemessen. Hierbei ergab sich selbst nach Zugabe von 20 μ Mol Milchsäure, was einer 100 %igen Umsetzung der eingesetzten 10 μ Mol Glukose zu Laktat entsprechen würde, nur eine Ansäuerung um maximal 0,12 pH-Einheiten.

3) pH-Verschiebung während der Versuche

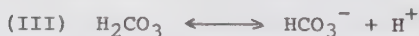
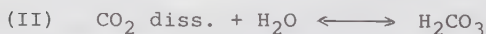
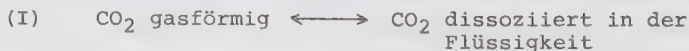
Obwohl durch die oben beschriebene Titration eine ausreichende Kapazität des verwendeten Puffers gegenüber der Milchsäure sichergestellt war, zeigte sich in den Versuchen

noch eine relativ große pH-Veränderung der Ansätze während der Inkubation. Eine Ursache dafür war sicherlich schon das Einpipettieren der sauren Bakteriensuspension in das Glukose-Puffer-Gemisch. Nach Untersuchung weiterer möglicher Einflüsse, wie z. B. Veränderung der angesetzten Pufferlösungen durch Temperaturerhöhung oder durch Luftzutritt, die nur sehr geringe, im Bereich des Meßfehlers liegende pH-Differenzen von höchstens $\pm 0,05$ Einheiten erbrachten, blieb als mögliche Hauptursache letztlich nur eine Ansäuerung durch das Begasen mit CO_2 . Einen Hinweis darauf lieferten auch die bei den Versuchen zu beobachtenden Veränderungen des Gasvolumens im Manometersystem. Es wurde deshalb eine Inkubation von 13 Ansätzen folgenden Inhalts durchgeführt:

- 5 ml Puffer in den verwendeten pH-Stufen (von 4,6... 5,2... bis 11,8)
- 1 ml Glukoselösung m/25
- 4 ml physiologische Kochsalzlösung (anstelle der Bakteriensuspension)

Ein Reaktionsgefäß mit 10 ml Aqua dest. diene als Thermobarometer. Nach 10 min. Begasen mit N_2/CO_2 -Gemisch wurde die Volumenänderung in den Manometersystemen während 150 Minuten Schüttelns alle 5 bzw. 10 Minuten protokolliert und anschließend das pH der Ansätze gemessen.

In Abbildung 7 wurde die Differenz zwischen Anfangs- und End-pH der Ansätze graphisch aufgetragen. Dieser pH-Verschiebung und der Volumenänderung in den Manometersystemen liegt folgende Reaktionskette zugrunde:



Vermehrtes Angebot von gasförmigem CO_2 (aus dem N_2/CO_2 -Begasungsgemisch) bewirkt also nach Gleichung I, II und III ein vermehrtes Auftreten freier H^+ -Ionen, die vom Puffer neutra-

lisiert werden müssen. Da die optimale Kapazität eines Puffers auf einen bestimmten pH-Bereich konzentriert ist (Allgemeine Puffercharakteristik; siehe LEHNINGER 1975), ergab sich im vorliegenden Versuch etwa ab dem Neutralpunkt eine mit steigendem pH-Wert größer werdende Ansäuerung. Die starke Volumenänderung in den ersten 10 bis 15 Minuten läßt außerdem den Schluß zu, daß die pH-Änderung bereits während der ersten Minuten der eigentlichen Inkubation erfolgte.

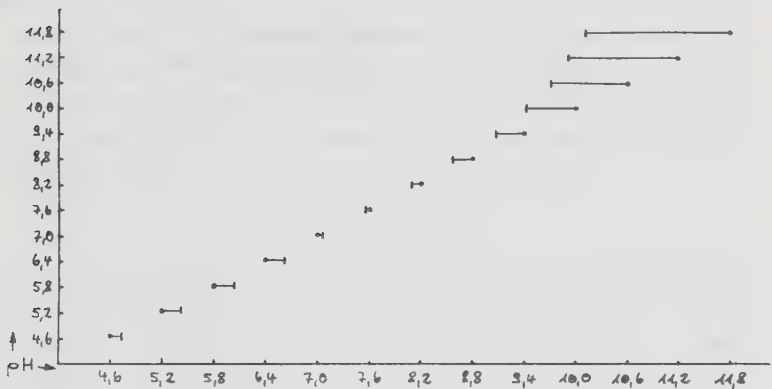


Abb. 7: Differenz zwischen Anfangs- (•) und End- (◻) pH der Ansätze bei Inkubation ohne Bakterien

4) Konstanz der Versuchsbedingungen

In den Versuchen wurde der Stoffwechsel der Bakterien bei unterschiedlichem pH gemessen. Voraussetzung für verwertbare Ergebnisse war also, daß in den einzelnen Ansätzen außer der variierenden Wasserstoffionenkonzentration gleiche Bedingungen herrschten. Ob dies in ausreichendem Maße der Fall war, untersuchten wir durch anaerobe Inkubation des Stammes 441. Dreizehn gleiche 2,5 ml Ansätze wurden mit Bikarbonatpuffer 120 min. im Warburgapparat inkubiert.

Vorher betrug das pH 8,2, danach schwankte es zwischen 6,7 und 6,9. Diese relativ geringe Streuung von 0,2 Einheiten zeigte, daß die Versuchsbedingungen ausreichend konstant waren. Vor allem eine inhomogene Verteilung der Bakterien, aus der größere Unterschiede der in den einzelnen Ansätzen vorhandenen Keimzahl und damit der von ihnen erzeugten Säuremenge resultieren könnten, müßte weiter streuende pH-Werte ergeben.

5) Aerobe Inkubation mit Stamm T 3/67 im Brutschrank

14 Ansätze mit Bakteriensuspension von Stamm T3/67 in den auch sonst verwendeten pH-Abstufungen (4 - 4,6 - 5,2 - ... - 11,8) wurden aerob im Brutschrank bei 37 ° C bebrütet. Nach 165 Minuten (Ansatz 1,3,5,...) bzw. 420 Minuten (2,4,6,...) erfolgte die pH-Messung und die Glukosebestimmung. Die Milchsäurekonzentration wurde nicht bestimmt.

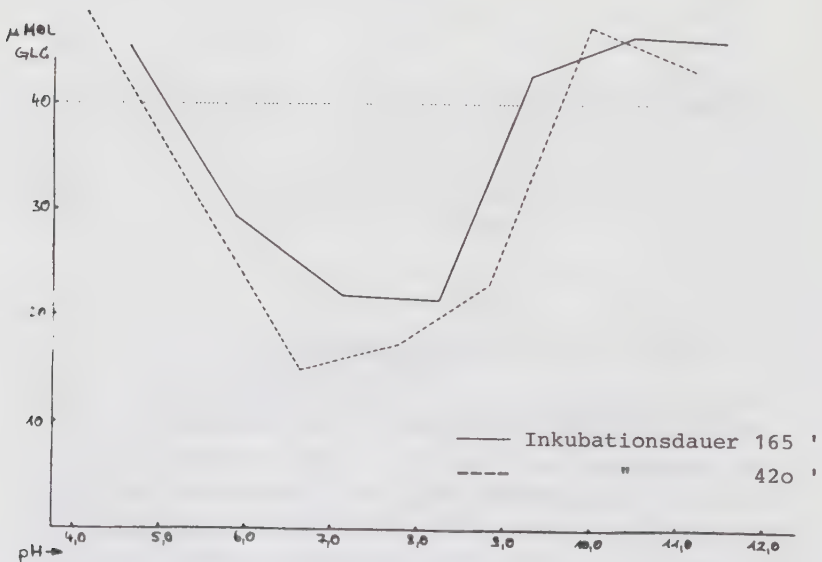


Abb. 8: Aerobe Inkubation Stamm T3/67
(nach Versuch noch vorhandene Glukose)

Die Ergebnisse (Abb. 8) seien kurz mit den Resultaten des entsprechenden anaeroben Versuches verglichen (s. Tab. 5 im Anhang):

- Nach 165 min. Inkubation lag der maximale Glukoseumsatz bei pH 8,25 (im anaeroben Versuch: 7,9), nach 420 min. bei 6,65. Interessant ist hier besonders die Verschiebung mit längerer Inkubationszeit, aus der sich die Frage ergibt, inwieweit die Lage des pH-Optimums von der Inkubationszeit beeinflusst sein könnte.
- Nur im stark alkalischen Milieu erfolgte eine pH-Verschiebung nach sauer, sonst ergab sich eine geringe, aber durchgehende Verschiebung nach alkalisch. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß die pH-Verschiebung bei den anaeroben Inkubationen durch das Begasen mit N_2/CO_2 verursacht wird.
- Der maximale Glukoseverbrauch nach 165 min. (47 % bei pH 8,2) war nur etwa halb so groß wie im anaeroben Versuch von etwa gleicher Dauer. Dies stimmt mit der Einstufung der Streptokokken als fakultative Anaerobier überein, die besagt, daß sie zwar unter aeroben Verhältnissen wachsen, jedoch einen größeren Stoffumsatz im anaeroben Milieu zeigen.
- Bemerkenswert ist weiterhin die sehr große Glukosefreisetzung unterhalb pH 5 und oberhalb pH 9,2, die bis zu ca. 20 % der eingebrachten Glukosemenge betrug, während bei der anaeroben Inkubation desselben Stammes in 2 Durchgängen keine zusätzliche Glukose nachweisbar war.

Gleichzeitig mit dem oben beschriebenen Versuch wurde noch ein weiterer Ansatz aerob inkubiert. Er bestand aus 10 ml Bakteriensuspension, also 2 1/2 mal soviel wie in den Versuchsansätzen. Hier wurde weder Substrat noch Puffer hinzugefügt. Das pH veränderte sich in 165 min. von 5,3 nach 4,7 bei einer Glukosefreisetzung von 13,2 μ Mol. Die pH-Erniedrigung zeigt, daß Säure produziert wurde, daß also ein Stoffwechsel stattgefunden hatte, obwohl kein Substrat

zugesetzt worden war. Anscheinend waren genug gespeicherte Reservekohlenhydrate vorhanden, um einen, wenn auch geringen Stoffwechsel zu unterhalten. Mögliche Gründe für die Glukosefreisetzung, die auch in den meisten anderen Versuchen zu beobachten war, werden in der Diskussion erörtert. Auch ROBERT und HAYES (1977) berichten von Versuchen, bei denen Plaque ohne Zusatz von Substrat metabolisch aktiv war, indem trotzdem Säure produziert wurde. Diese Autoren schreiben der Säurebildung aus endogenen Substraten bei Abwesenheit von Nahrungskohlenhydraten eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Plaque zu.

V. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

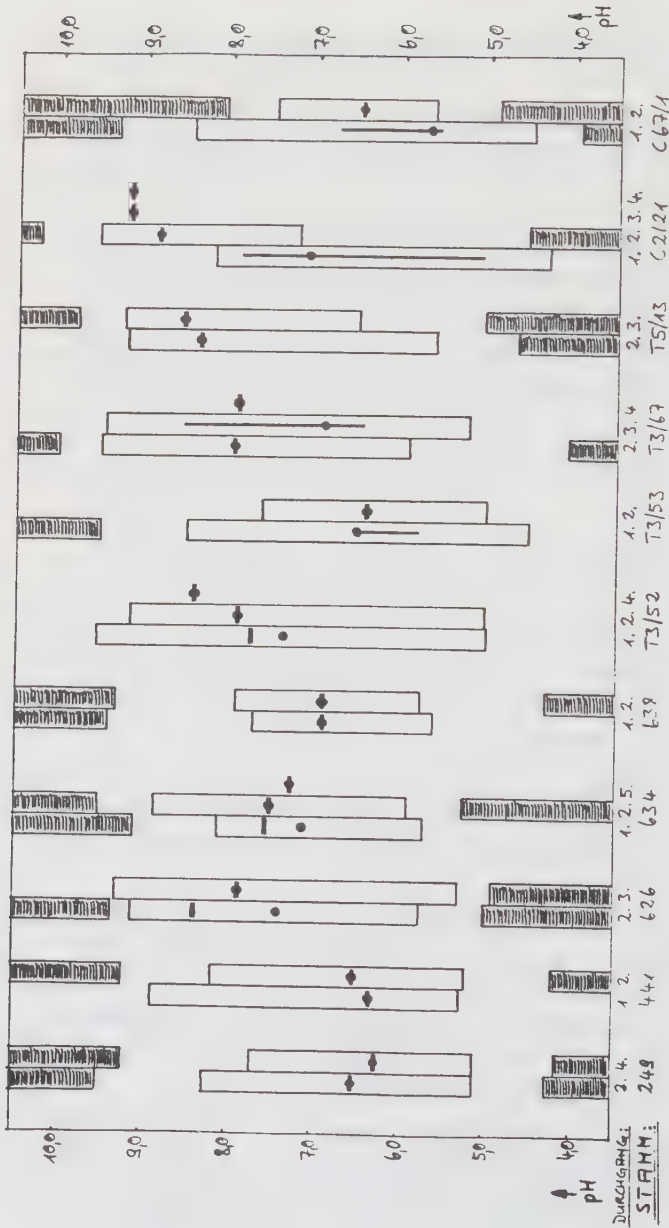
Die mit 11 Streptokokkenstämmen in jeweils 14 pH-Stufen durchgeführten Inkubationen brachten zusammengefaßt folgende Ergebnisse:

- 1) Ein einheitliches pH-Optimum für die 11 Stämme kann nicht angegeben werden, jedoch mit einer gewissen Schwankungsbreite für jeden einzelnen, mit Ausnahme von Stamm C 2/21.
- 2) Der Umsetzungsgrad Glukose zu Milchsäure schwankt relativ stark und zeigt eine Abhängigkeit vom pH.
- 3) In den extremen pH-Bereichen nimmt der Stoffumsatz stark ab.
- 4) Bei niedrigem und hohem pH ist in der Mehrzahl der Durchgänge eine Glukosefreisetzung zu beobachten.

Die wichtigsten Daten der ausgewerteten Durchgänge sind in dem Blockdiagramm (Abb. 9) auf der folgenden Seite zusammengefaßt. Die pH-abhängigen Aktivitätskurven der 11 Stämme finden sich im Anhang.

Die Ergebnisse können neben den bereits erwähnten Fehlermöglichkeiten der enzymatischen Tests (siehe Kap. E1) auch bakterienbedingte Einflüsse enthalten, die hier kurz zusammengefaßt seien:

- Es ist wahrscheinlich, daß sich bei alten, oft überimpften Kulturen (z.B. bei den Würzburger Referenzstämmen 638 und 249) die biochemischen Eigenschaften verändert haben, so daß sich bei Vergleichen ihrer Stoffwechseleigenschaften mit jüngeren Isolierungen (z.B. die Turku Stämme) irreführende Folgerungen ergeben können.
- Das verschieden schnelle Anwachsen der Bakterien in der Nährbouillon ergibt ein verschiedenes Verhältnis von lebenden zu toten Zellen in den Inkubationslösungen (SCHMID 1974), wodurch die Mengen der verbrauchten Glukose und der gebildeten Milchsäure beeinflußt werden.

Abb. 9: GESAMTÜBERSICHT DER VERSUCHSERGEBNISSE

— bzw. | pH-Optimum für Glc-Umsatz • pH-Optimum für MS-Bildung

□ Stoffwechsel 50 %

▨ Glc-Freisetzung

- Einen nicht näher bestimmbaren Einfluß auf den Stoffumsatz der Bakterien hat auch die am jeweiligen Versuchstag herrschende Witterung.
- Schließlich sind die Ergebnisse aller Versuche mit Mikroorganismen von der Versuchsanordnung und von den verwendeten Substanzen abhängig, so z.B. von der Inokulation und der Zusammensetzung des Nährbodens. Wünschenswert wären hier Versuche mit Standardkulturen, die - im Idealfall - aus identischen Bakterien mit gleichem Generationswechsel bestehen würden.

Im einzelnen kann zu den Ergebnissen folgendes gesagt werden:

- 1) Das pH-Optimum liegt - mit relativ großen Unterschieden von Stamm zu Stamm - zwischen pH 6,4 und 8,5.

249	6,4	634	7,4	
441	6,4	T3/67	7,9	C2/21 ?
T3/53	6,4	626	8,0	
C67/1	6,4	T3/52	8,0	
638	6,9	T5/13	8,5	Durchschnitt 7,2

Dies ist jeweils der Mittelwert aus 2 bzw. 3 Durchgängen, die von ihm um 0,1 bis 0,3 Einheiten abweichen. Berücksichtigt wurden die pH-Werte des maximalen Glukoseverbrauchs sowie die der größten Milchsäurebildung. Da die Versuche mit relativ großen pH-Abstufungen (0,6 Einheiten) durchgeführt wurden, muß man als Fehlerbreite etwa $\pm 0,3$ Einheiten zugrunde legen.

Für Stamm C2/21 kann kein Optimum angegeben werden. Seine Aktivitätskurven weisen untereinander keinerlei Ähnlichkeit auf (s. Anhang). Schon in früheren Untersuchungen hatte dieser Stamm von Versuch zu Versuch sehr unterschiedliche und kaum reproduzierbare Stoffwechselleistungen gezeigt. Die Glukose war bei 4 der verwerteten Inkubationen (T3/53 1.D; T3/67 3.D; C2/21 1.D; C67/1 1.D) nach dem Versuch in mehreren Ansätzen vollständig verbraucht. Hier ist jedoch das Optimum durch die anderen Durchgänge festgelegt. Die

maximale Milchsäurebildung liegt fast immer bei demselben pH wie der maximale Glukoseverbrauch.

Mit dem auf einen weiten pH-Bereich einstellbaren und dadurch nicht mehr so exakt arbeitenden Puffersystem mußten gewisse Ungenauigkeiten in Kauf genommen werden. Trotzdem kann aufgrund der erzielten Ergebnisse gesagt werden, daß mit Ausnahme von C2/21 jeder untersuchte Stamm an einem für ihn charakteristischen, engen pH-Bereich den größten Umsatz zeigt. Unsere für isolierte *Streptokokkus mutans*-Stämme gefundenen Werte stimmen nicht in allen Fällen mit den in der Literaturübersicht zitierten Angaben über das allgemeine pH-Optimum der Streptokokken überein (6,0 - 7,2 bei LAMMERS und HAFER 1956; 5,4 - 7,0 bei SAUERWEIN 1974). Wie bereits erwähnt, wäre eine denkbare Ursache hierfür, daß sich mit zunehmendem Alter der Kultur, also längere Zeit nach der Isolierung aus Plaquematerial, oder in Abhängigkeit vom verwendeten Nährboden die charakteristischen Eigenschaften der Keime verändern.

Gewissermaßen als Maß für die "pH-Toleranz" der Streptokokken wurde versuchsweise ein Stoffwechselbereich errechnet, in dem mehr als 50 % des maximalen Glukoseumsatzes des betreffenden Durchganges erreicht worden war (siehe Abb. 9). Die Breite dieses Bereiches erstreckt sich über ca. 2 bis 4,5 pH-Einheiten. Teilweise stimmt er für die beiden Durchgänge der Stämme relativ gut überein (z.B. Stamm 626, 638, T3/52). Andererseits zeigen sich jedoch bei einigen Stämmen (T3/53, C2/21, C67/1) große Unterschiede, was wohl auf von Tag zu Tag variierende Stoffwechselleistungen (besonders Stamm C2/21) und zusätzlich wahrscheinlich auch experimentelle Schwierigkeiten zurückzuführen ist. Insgesamt ist ein solcher Stoffwechselbereich mit zu vielen versuchsbedingten und durch die Bakterien selbst verursachten Ungenauigkeiten verbunden und kann daher kaum zur näheren Bestimmung der pH-Abhängigkeit des Stoffwechsels herangezogen werden.

2) Der Umsetzungsgrad Glukose zu Milchsäure am pH-Optimum beträgt im Durchschnitt 59 %, schwankt jedoch relativ stark von etwa 40 - 90 %. Dies ist unter Berücksichtigung der Tatsache, daß außer den Säuren auch andere, nicht saure Abbauprodukte entstehen, gut mit den Werten vergleichbar, die PFANNENSTIEL (1972) als Anteil der Milchsäure an den Gesamtsäuren fand (57 - 82 %). JORDAN (1965) und MOLL (1970) geben allerdings 80 - 90 % Umsatz der Glukose zu Milchsäure an.

Ein überraschendes Ergebnis brachte die Betrachtung des Umsetzungsgrades Glukose zu Milchsäure in Abhängigkeit vom pH-Wert. Diese Umwandlung geschah bei den verschiedenen pH-Stufen in unterschiedlichem Prozentsatz. Man kann daraus schließen, daß das Produktspektrum des Streptokokkenstoffwechsels nicht nur vom angebotenen Substrat, wie DALLMEIER et al. (1970) feststellten, sondern auch von der Wasserstoffionenkonzentration beeinflusst wird.

Diese Beobachtung wurde inzwischen von DISTLER und KRÖNCKE (1978) näher untersucht und veröffentlicht. Sie ermittelten die Größe des Stoffwechsels und die prozentuale Verteilung der Endprodukte unter dem Einfluß abnehmender Pufferkonzentrationen, die sich infolge ihrer geringer werdenden Kapazität als zunehmende Säuregrade auswirkten. Unter diesen Voraussetzungen wurde zwar der Gesamtumsatz geringer, der Prozentanteil der Milchsäure an den nachgewiesenen Endprodukten stieg jedoch auf Kosten der anderen gebildeten Säuren deutlich an. Der Grund für diesen relativen Anstieg des Milchsäureanteils dürfte in der pH-abhängigen Aktivität der beteiligten Enzyme liegen. Scheinbar werden bei sinkendem pH bestimmte Glieder der intrazellulären Enzymsysteme gehemmt oder aktiviert und damit das Gleichgewicht der verschiedenen Reaktionen zu bestimmten Endprodukten hin verschoben.

Durch die Berechnung des Umsetzungsgrades Glukose zu Milchsäure aus den Glukose- und Milchsäurewerten werden eventuelle Meßfehler der enzymatischen Tests vervielfacht. Der

relativ gleichmäßige Verlauf der Aktivitätskurven ist deshalb bei den graphischen Darstellungen dieses Umsetzungsgrades oft nicht mehr so eindeutig erhalten. Trotzdem lassen sich zwei auffallend verschiedene Kurvenformen unterscheiden:

Form A: Relativ gleichmäßiger Anstieg bei sauerem pH und ebenso gleichmäßiger Abfall im alkalischen Bereich.

Form B: Sinkende Werte etwa bis zum Neutralpunkt, dann wieder aufsteigend. Erst bei extrem sauren (kleiner als 5) oder basischen (größer als 10) pH-Werten rasches Abfallen auf niedrige Werte.

Die Abbildung 10 (S. 38) zeigt für jede Form zwei Beispiele. Diese beiden Kurvenformen können keinesfalls als Zufallsergebnisse gewertet werden, was besonders beim Vergleich der beiden Durchgänge jeweils eines Stammes auffällt. Hier zeigt sich nämlich, daß in keinem Fall bei demselben Stamm Form A und B zusammentreffen, wohl aber sechsmal beide Durchgänge und zweimal einer eindeutig entweder der einen oder der anderen Form zuzuordnen sind. Es ergibt sich also folgende Zusammenstellung:

Beide Durchgänge Form A: T3/52
 T3/67
 T5/13
 C2/21

Beide Durchgänge Form B: 249
 638

Ein Durchgang Form A: 626

Ein Durchgang Form B: 441

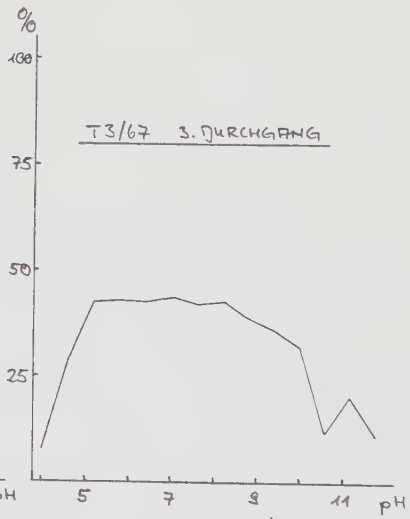
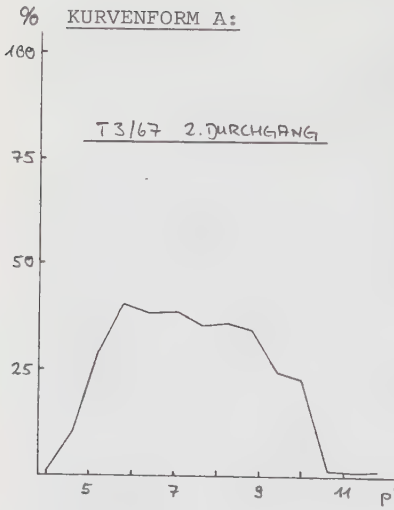
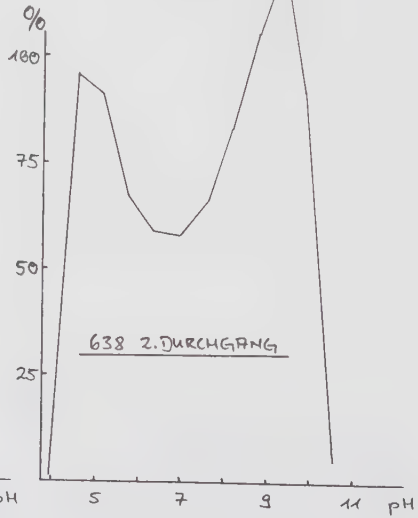
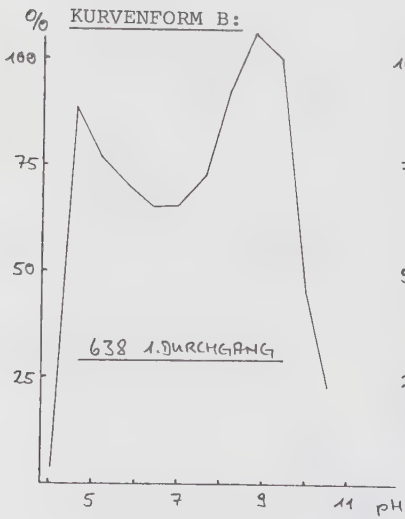
Drei Stämme (441; 634; C67/1) sowie die übrigen Durchgänge von 626 und 441 lassen sich nicht zweifelsfrei einordnen. Die Tatsache, daß bei zwei der untersuchten Stämme der Umsetzungsgrad Glukose zu Milchsäure ober- und unterhalb des Neutralpunktes ansteigt, während bei vier anderen dieser An-

stieg offensichtlich nicht eintritt, wirft die Frage auf, inwieweit dieses nach den vorliegenden Versuchen so charakteristisch scheinende Verhalten als stabile Eigenschaft der einzelnen Stämme gewertet werden kann.

Durch die serologische Eingruppierung kann der Unterschied zwischen Gruppe A und B nicht erklärt werden. Es fällt allerdings auf, daß Form A mit Ausnahme von 626 nur bei den Turku-Stämmen vorkommt, die bekanntermaßen relativ junge Isolierungen sind, während z.B. Stamm 249 (in Gruppe B) schon vor vielen Jahren aus Plaquematerial isoliert wurde. Eine Mutation bestimmter Eigenschaften, wie im vorliegenden Fall der Milchsäurebildung, während vieler Generationsfolgen auf künstlichen Nährböden wäre durchaus möglich und würde den Unterschied zwischen Form A und B erklären.

Eine Weiterverwertung der Milchsäure durch die Streptokokken dürfte - wenn überhaupt - nur in sehr geringem Umfang stattgefunden haben. HU und SANDHAM (1972) fanden zwar eine Lactatverwertung durch Streptokokken, doch sie führten ihre Versuche mit sehr hoher Bakteriendichte und geringem Glukoseangebot durch. Die Fähigkeit, Lactat für den Stoffwechsel nutzbar zu machen, ist wohl nur als Ausweg bei Substratmangel zu werten. Solche Voraussetzungen waren in unseren Versuchen nicht gegeben, könnten jedoch in der Mundhöhle eine Rolle spielen. Daß in der Plaque ein Abbau der von den Streptokokken und anderen Mikroorganismen gebildeten Milchsäure durch Veillonellen stattfindet, ist in der Literatur bereits vor einigen Jahren beschrieben worden (KÖNIG 1971; MÜHLEMAN 1974).

Abb. 10:

UMSETZUNGSGRAD GLC ZU MSKURVENFORM A:KURVENFORM B:

3) Bei stark sauren bzw. basischen pH-Werten fällt der Stoffumsatz der untersuchten Streptokokken meist steil auf geringe Werte ab, was trotz relativ großer Einflüsse von Meßfehlern in diesem Bereich an den Aktivitätskurven mit den Glukose- und Milchsäurewerten deutlich ablesbar ist. In der Literaturübersicht sind einige Arbeiten von Autoren beschrieben, die sich mit dem Stoffumsatz der Streptokokken in den extremen pH-Bereichen befaßten (siehe Abb. 2 bis 6). Anhand unterschiedlicher Meßgrößen wie Lactatbildung und Vermehrung, fanden auch sie stark absinkende Werte in sauren und basischen Inkubationslösungen. Zum Beispiel das bei FUTAKAMI et al. (1976) beschriebene Absinken der Lactatproduktion bei pH 4 auf 8 - 20 %, bezogen auf diejenige am Neutralpunkt, entspricht ziemlich genau den von uns gefundenen Werten.

Als Vorgänge, die sich bei niedrigem und hohem pH an den Bakterienzellen abspielen, ist besonders die von BELCOURT beschriebene Aggregation hervorzuheben sowie die von TYTGAT gefundene Auflösung. Bei ersterem war eine Zusammenballung der Zellen im sauren Bereich erst unterhalb von pH 4,5 zu beobachten, im alkalischen Bereich zwischen pH 7 und 9 jedoch in großem Ausmaß. Diese Reaktion kann möglicherweise als Schutz- oder Abwehrmaßnahme der Keime gegen ungünstige Milieubedingungen gedeutet werden.

In einer Bakterienkultur sterben zu jeder Zeit Zellen ab, die vermutlich nach einer gewissen Dauer vom umgebenden Medium oder auch von eigenen Enzymen zerstört werden. So sinkt der von TYTGAT gemessene Prozentsatz an Bakterien, die sich nach 30 min. Kontakt mit Pufferlösungen bestimmter Wasserstoffionenkonzentrationen auflösten, nicht bis auf Null, sondern zwischen pH 6 und 8,5 nur bis zum Minimum von ca. 12 - 15 %. Besonders im alkalischen Bereich über 10 tritt jedoch eine bis zu 100 %ige Lyse auf. Dies bedeutet, daß hier die Bakterien irreversibel geschädigt werden.

Mit Bezug auf die vorliegenden Versuche kann man also folgendes feststellen: Von einem pH-Optimum aus, an dem der

Stoffumsatz der Streptokokken die größten Werte erreicht, kommt es mit steigendem bzw. fallendem pH zunächst zu einer Verminderung des Substratumsatzes durch ungünstiger werdende Bedingungen, was schließlich bei extremen pH-Werten in einem vollständigen Stillstand der intrazellulären Vorgänge und einer Zerstörung der Zellstrukturen endet. Dabei scheinen die Keime ein saures pH relativ besser zu tolerieren als ein alkalisches, was auch bei den Zellen des menschlichen Körpers der Fall ist.

4) Bei niedrigem und hohem pH war in der Mehrzahl der Durchgänge nach der Inkubation mehr Glukose vorhanden als vorher einpipettiert worden war. Es muß also in diesen Ansätzen neben dem vergleichsweise niedrigen Glukoseabbau auch eine Freisetzung von Glukose stattgefunden haben. Diese erfolgte möglicherweise nicht nur in den extremen pH-Bereichen, sondern auch bei den mittleren pH-Werten, wo sie infolge des relativ großen Glukoseumsatzes nicht nachweisbar war. Dafür sprechen die Ergebnisse von MOLL (1970), der bei einem pH von etwa 7,5 in allen seinen Versuchen mit 5 verschiedenen Streptokokkenstämmen eine Mobilisierung intrazellulärer Glukose fand.

Für die Herkunft dieser Glukose gibt es verschiedene mögliche Erklärungen, von denen wir mit der unwahrscheinlichsten beginnen:

- Glukose ist als Baustein in verschiedenen Zellstrukturen vorhanden. Sie wird frei, wenn die Zellen absterben und in ihre kleinsten Bestandteile zerlegt werden, was unter Umständen bei extremen pH-Werten verstärkt geschieht. Eine Auflösung toter Zellen vermutet auch SCHMID (1974) anhand von Vergleichen der optischen Dichte. Damit kann jedoch kaum die relativ große Menge der freigesetzten Glukose erklärt werden.
- Während der Anzüchtung haben die Keime Gelegenheit, Energiereserven in Form von IPS anzulegen, die jederzeit wieder zerlegt und in den Stoffwechsel eingebracht werden

können. Unter dem Einfluß bestimmter (extremer) pH-Werte sind Permeabilitätsveränderungen der Zellwand denkbar, durch die laufend intrazellulär für den Stoffwechsel bereitgestellte Glukose nach außen ins extrazelluläre Milieu, also in die Inkubationslösung, abfließt. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn die intrazelluläre Phosphorylierung der Glukose bereits blockiert ist.

- Verdünnte Säuren und Laugen greifen Polysaccharide an und bauen sie durch Hydrolyse ab. Als Endprodukt erscheint - abhängig vom zerlegten Polysaccharid - u.a. auch Glukose. Es ist möglich, daß dieser Vorgang im sauren bzw. basischen Milieu der Inkubationslösungen mit den gespeicherten EPS abläuft, so wie er auch zum Nachweis von EPS experimentell ausgenützt wird (GEHRING 1972). Dasselbe kann auch mit den IPS geschehen, wenn man voraussetzt, daß durch die extremen pH-Werte eine Zellwandschädigung eintritt.

Von diesen Erklärungen erscheint uns die Hydrolyse am wahrscheinlichsten. Genaue Auskunft über den Weg der Glukose im Energie- und Baustoffwechsel der Streptokokken könnte man durch Anzucht der Keime mit markiertem Substrat erhalten.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Anhand des Glukoseabbaues und der daraus resultierenden Milchsäurebildung wurde die pH-Abhängigkeit des Stoffwechsels von 11 Streptokokkus mutans-Stämmen untersucht und miteinander verglichen. Der Warburgapparat ermöglichte die gleichzeitige anaerobe Inkubation von jeweils 14 Ansätzen in ebenso vielen pH-Abstufungen. Im Anschluß wurde die nicht abgebaute Glukose und die gebildete Milchsäure enzymatisch bestimmt.

Die Versuche führten zu folgenden Ergebnissen:

- 1) Das pH-Optimum lag - mit relativ großen Unterschieden von Stamm zu Stamm - zwischen pH 6,4 und 8,5. Ein Stamm (C2/21) war in dieser Hinsicht nicht beurteilbar.
- 2) Der Umsetzungsgrad von Glukose zu Milchsäure schwankte im pH-Optimum zwischen 40 und 90 %. Im Durchschnitt aller untersuchten Stämme beträgt er 59 %. Die Umsetzung erwies sich als pH-abhängig, wobei diese Abhängigkeit zwei verschiedene, charakteristische Verlaufsformen aufweist.
- 3) Im stark saueren bzw. im basischen pH-Bereich fiel der Stoffwechsel der untersuchten Streptokokken meist steil auf geringe Werte ab.
- 4) In den extremen pH-Bereichen war bei der Mehrzahl der inkubierten Bakteriensuspensionen eine Glukosefreisetzung zu beobachten, was wahrscheinlich auf Hydrolyse der Zellen zurückzuführen ist. Vermutlich stammt zusätzlich freigesetzte Glukose aus Reservekohlenhydraten der Bakterienzellen.

VII. SCHRIFTTUM

- BELCOURT, A., KROELY, F. und FRANK, R.M.: Effet de divers cations et de variations de pH sur l'agregation bacterienne experimentale
Biol. Buccale, 2, 189-198 (1974)
- BERGEY, D.H.: Manual of Determinative Bacteriology
Williams and Wilkins, Baltimore (1957)
- BERGMEYER, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, Weinheim (1962)
- BIBBY, B.G. und SHAW, J.H.: Diet and dental caries
Internat. Deut. J., 15, 1 (1965)
- BRAMSTEDT, F. und TRAUTNER, K.: Zuckeraustauschstoffe und Biochemie der Zahnplaques
Dtsch. zahnärztl. Zeitschr., 26, 1135 (1971)
- BROWN, H.K. und POPLOVE, M.: The Brantford-Sarnia-Stratford flouridation caries study: final survey
J. Canad. dent. Ass., 31, 505 (1965)
- DALLMEIER, E.: Vergleichende Untersuchungen über den Glukose- und Hexitstoffwechsel von Plaque-Streptokokken
Naturwiss. Diss. Erl. (1970)
- DALLMEIER, E., BESTMANN, H.-J. und KRÖNCKE, A.: Über den Abbau von Glukose und Sorbit durch Plaque-Streptokokken
Dtsch. zahnärztl. Zeitschr., 25, 887 (1970)
- DISTLER, W. und KRÖNCKE, A.: Vortrag auf dem 25th ORCA-Congress Turku (1978)
- EGOROV, N.S., BARANOVA, J.P. und GRUSLINA, V.A.: Effect of the Initial PH-Value of the Medium on the Growth of Streptococcus Lactis and the Biosynthesis of Nisin
Antibiotiki, 21, 499 (1976)
- FITZGERALD, R.J. und KEYES, P.H.: Demonstration of the etiology role of streptococci in experimental caries in the hamster
J. Amer. dent. Ass., 61, 23 (1960)
- FOSDICK, L.S.: Some new concepts concerning the role of sugar in dental caries
Oral Surg., 5, 615 (1952)

- FREEDMAN, M.L. und COYKENDALL, A.L.: Variation in Internal Polysaccharide Synthesis among Streptococcus mutans Strains
Infection and Immunity, 12, 475-479 (1975)
- FROSTELL, G.: Studies in oral biochemical bakteriologi
Acta odont. scand., 18, 29 (1960)
- FROSTELL, G.: Plaque metabolism and substrate concentration
Acta odont. scand., 20, 335 (1962)
- FROSTELL, G.: Quantitative determination of the acid production from different carbohydrates in suspensions of dental plaque material
Acta odont. scand., 22, 457 (1964)
- FROSTELL, G.: Dental plaque-pH in relation to intake of carbohydrate products
Acta odont. scand., 27, 3-29 (1969)
- FROSTELL, G.: The Effect of chewing on the pH of dental plaque after carbohydrate consumption
Acta odont. scand., 32, 79 (1974)
- FUTAKAMI, K., SATO, S. und IWAMI, Y.: Lactate Formation at various pH-levels by the Wild Strain of Streptococcus mutans PK 1, its variant and Streptococcus sanguis
J. Dent. Res., 55, 1131 (1976)
- GEEVER, E.F., LEONE, N.C., GEISER, P. und LIEBERMAN, J.: Pathologic studies in man after prolonged ingestion of fluoride in drinking water
J. Amer. dent. Ass., 56, 499 (1958)
- GEHRING, F.: Extrazelluläre Polysaccharide bildende Streptokokken aus Zahnplaque und ihre Beziehung zur Zahnkaries
Karl Hanser Verlag, München (1972)
- GEHRING, F., MÄKINEN, K.K., LARMAS, M. und SCHEININ, A.: Turku sugar studies IV: An intermediate report on the differentiation of polysaccharid forming streptococci (S. mutans)
Acta odont. scand., 32, 435 (1974)
- GIBBONS, R.J. und SOCRANSKY, S.S.: Intracellular polysaccharide storage by organisms in dental plaque
Arch. oral Biol., 7, 73 (1962)
- GRIFFITH, C.J. und MELVILLE, T.H.: Growth of Oral Streptococci in a Chemostat
Arch. oral Biol., 19, 87 (1974)

- GUSTAFSSON, B.E.: Germ-free rearing of rats
Acta path. microbiol. scand., 73, 146 (1948)
- HABS, H. und SEELIGER, H.P.: Bakteriologisches Taschenbuch
Joh. Ambr. Barth 38. Auflage, München (1967)
- HAGAN, T.L., PASTERNAK, M. und SCHOLZ, G.C.: Waterborne
fluorides and mortality
US Public Health Reports, 69, 450 (1954)
- HAHN, G., HEESCHEN, W. und TOLLE, A.: Streptococcus -
Eine Studie zur Struktur, Biochemie, Kultur
und Klassifizierung
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte,
22, Heft 4 Hildesheim (1970)
- HAHN, G., WENTRUP, M. und REICHMUTH, J.: Zur quantitativen
Analyse des Milchsäure- und Dextranbildungsver-
mögens von Streptokokken aus Plaque kariesakti-
ver und kariesfreier Zähne
Dtsch. zahnärztl. Zeitschr., 28, 1119 (1973)
- HARDWICK, J.L.: The fluoride content of the plaque: Its
possible Antienzymatic Action
Karies Symposium Zürich, 112-119 (1961)
- HARDIE, J.: Anaerobes in the Mouth; aus: "Infection with
non-sporing anaerobic bacteria"
A Symposium of the British Society for Antimi-
crobial Chemotherapy
Ed. J. Phillips and M. Sussman
Churchill Livingstone, Edinburgh, London and
New York (1974)
- HOFMANN-AXTHELM, W.: Lexikon der Zahnmedizin
Quintessenzverlag Berlin 1974
- HIGUCHI, M., ARAYA, S. und HIGUCHI, M.: Plasmid DNA Sa-
tellite Bands Seen in Lysates of Streptococcus
mutans that Form Insoluble Extracellular Poly-
saccharides
J. Dent. Res., 55, 266 (1976)
- HU, G. und SANDHAM, H.J.: Streptococcal utilization of Lac-
tic Acid and its Effect on pH
Arch. oral Biol., 17, 729 (1972)
- JENKINS, G.N.: Biochemie von Plaque und Karies, speziell
im Hinblick auf Fluoride;
in: Forum Medici: Metabolismus und Kariogeni-
zität der Zahnplaque
Zyma Nyon Switzerland (1974)
- JORDAN, H.V.: Bacteriological Aspects of Experimental Den-
tal Caries
Ann. N.Y. Acad. Sci., 131, 905 (1965)

- KLEINBERG, J. und JENKINS, G.N.: The pH of dental plaque in the different areas of the mouth before and after meals and their relationship to the pH and rate of flow of resting saliva
Arch. oral Biol., 9, 493 (1964)
- KOELLE, O.: Manometrie
B. Braun Apparatebau Melsungen
- KÖNIG, K.G.: Karies und Kariesprophylaxe
2. Aufl. Goldmann Verlag München (1971)
- KRÖNCKE, A.: Freie Zucker im menschlichen Nüchternspeichel
Joh. Ambr. Barth, Leipzig (1959)
- LAMMERS, T.H. und HAFFER, H.: Biologie der Zahnkaries
Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg (1956)
- LEHNINGER, A.L.: Biochemie
Verlag Chemie Weinheim (1975)
- MATHIS, H.: Caries dentium
Urban und Schwarzenberg, Wien (1947)
- MESCHEDE, U.H.: Vergleichende Untersuchungen über den anaeroben Abbau von Saccharose, Glukose u. Fructose durch isolierte Mundhöhlenstreptokokken
Med. Diss. Erl. (1969)
- MILLER, W.D.: Die Mikroorganismen der Mundhöhle
Thieme Verlag, Leipzig (1889) (im Neudruck bei Karger, Basel 1973)
- MILLER, B.F., MUNTZ, J.A. und BRADEL, S.: Decomposition of carbohydrates by dental plaque material
J. dent. Res., 19, 473 (1940)
- MOLL, C.P.: Quantitative enzymatische Bestimmung des Glukoseabbaues und der Milchsäurebildung durch isolierte Plaque-Streptokokken
Med. Diss. Erl. (1970)
- MÜHLEMANN, H.R.: Einführung in die orale Präventivmedizin
Verlag Hans Huber, Stuttgart (1974)
- NEUWIRTH, J. und SUMMERSON, W.H.: The Production of Acids from Glucose by Oral Microorganisms: Lactate and Pyruvate
J. Dent. Res., 30, 100 (1951)
- OCHSENBEIN, H.: Chlorhexidin in der Zahnheilkunde - aktueller Stand der Forschung.
"Acta parodontologica" in Schweiz. Mschr. Zahnheilkunde, 84, 459 (1974)

- ORLAND, F.J., BLAYNEY, J.R. und HARRISON, R.W. et al.:
Use of the germfree animals technic in the
study of experimental dental caries I. Basic
observations on the rats reared free of all
microorganisms
J. dent. Res., 33, 147 (1954)
- ORLAND, F.J., BLAYNEY, J.R. und HARRISON, R.W. et al.:
Experimental caries in germfree rats inocu-
lated with enterococci
J. Amer. dent. Ass., 50, 529 (1955)
- ORLAND, F.J.: A review of dental research using germfree
animals
Ann. N.Y. Acad. Sci., 78, 285 (1959)
- PFANNENSTIEL, K.U.: Vergleichende Untersuchungen über die
Säureproduktion bestimmter Plaquestreptokokken
in Glukose- und Sorbitnährmedien
Med. Diss. Würzburg (1972)
- RANKE, B., BRAMSTEDT, F. und NAUJOCKS, R.: Untersuchungen
mit markierten Verbindungen über den Kohlen-
hydratabbau in den Plaques
Adv. in Fluorine Res., 2, 189 (1964)
- RANKE, E., RANKE, B., AHRENS, G. und HEESCHEN, W.: Plaque-
flora und Zahnkaries
2. Mitteilung: Vorkommen dextranbildender
Streptokokken
Dtsch. zahnärztl. Zeitschr., 24, 880 (1969)
- RANKE, E. und RANKE, B.: Plaqueflora und Zahnkaries
3. Mitteilung: Ein Beitrag zur Kenntnis der
biochemischen Leistungsfähigkeit der Strepto-
kokkenarten Viridans u. der serologischen Grup-
pe K aus Zahnplaque kariesfreier und kariesak-
tiver Personen
Dtsch. zahnärztl. Zeitschr., 25, 1164 (1970 b)
- RANKE, E. und RANKE, B.: Zur Bedeutung verschiedener Plaque-
streptokokken für die Karies
Dtsch. zahnärztl. Zeitschr., 25, 270 (1970 a)
- RANKE, E. und RANKE, B. und HAHN, G.: Vergleichende Unter-
suchungen der Zahnplaques kariesaktiver und
kariesfreier Schüler
Dtsch. zahnärztl. Zeitschr., 31, 26 (1976)
- RAUEN, H.M.: Biochemisches Taschenbuch
Band II, S. 90 Springer Verlag (1964)
- ROBERTS, K.R. und HAYES, M.L.: Plaque acid metabolism.
J. dent. Res., 56, 93 (1977)

- SAUERWEIN, E.: Kariologie
Thieme Verlag, Stuttgart (1974)
- SCHLEGEL, H.G.: Allgemeine Mikrobiologie
Thieme Verlag, Stuttgart (1976)
- SCHMID, F.: Wachstumsverhalten kariogener Streptokokken
auf Glukose-Nährböden
Med. Diss. Erl. (1974)
- STEPHAN, R.M.: Changes in the hydrogen-ion concentration
on tooth surfaces and in carious lesions
J. Amer. dent. Ass., 27, 718 (1940)
- de STOPPELAAR, J.D. und van DAMME, A.E.M.: The influence
of pH on the Synthesis and Degradation of Intra-
cellular Jodophilic Polysaccharide by Strepto-
coccus mutans.
in: "Abstracts" des ORCA-Kongresses, Megeve
(1977)
- STRALFORS, A.: Studies of the microbiology of caries II:
The acid fermentation in the dental plaque in
situ compared with lactobacillus
J. dent. Res., 27, 576 (1948)
- TANZER, J.M., KRICHEVSKY, M.J. und KEYES, P.H.: The meta-
bolic fate of glucose catabolized by a washed
stationary phase cariesconductive streptococcus
Caries Res., 3, 167 (1969)
- TYTGAT, M.F., MOCK, M. und FLECK, J.: Influence du pH sur
des bacteries en phase de croissance
C.R. Acad. Sc. Paris, t 281 Serie D 1277 (1975)
- UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. und STAUFFER, J.F.: Manometric
Techniques Burgess Publishing Comp. 4th ed.
Minneapolis (1964)
- WIELINGER, H.: GOD-Perid-Methode, ein neues, überlegenes
Verfahren zur enzymatischen Blutzuckerbestim-
mung
Krankenhausarzt Heft 9 (1970)
- YUDKIN, J.: Medizin und Ernährung
zitiert bei Cremer H.D.: Ernährungsphysiologi-
sche Aspekte zum Konsum von Zucker und Zucker-
austauschstoffen
Dtsch. zahnärztl. Zeitschr., 26, 1041 (1971)

VIII. ANHANG

Tab. 2: Versuchsprotokoll I des 1. Durchgangs
Stamm 638

STAMM: 638

1. DURCHGANG

DATUM: 25.8.77

pH-Balken-nump. 4,5

Gefäß Nr.	pH Puffer vom Umrühren	GLUCOSE		MILCHSÄURE			E ₁ (zu Beginn)	E ₂ (nach 10')	E (E ₂ -E ₁)	ΔE (E-E ₁)	C _{18/12} ($\frac{0,08 \cdot \Delta E}{E_1}$)	pH-Wert ($\frac{1}{10} \cdot \frac{1}{10} \cdot \frac{1}{10}$)
		mg/100ml ($\frac{\text{mg/100ml} \times 100}{0,05538}$)	mg/100ml ($\frac{\text{mg/100ml} \times 100}{0,05538}$)	E _{L1}	E _{L2}	ΔE _L						
5	4,0	680,4	37,7	0,378	0,484	0,020	0,379	0,404	0,025	0,035	0,0046	0,18
14	4,6	670,8	37,5	0,379	0,397	0,020	0,377	0,549	2,142	0,122	0,0338	4,43
16	5,2	481,0	26,0				0,376	0,302	0,586	0,566	0,1848	20,5
24	5,8	531,8	18,2				0,375	1,221	0,460	0,826	0,2637	30,0
26	6,4	163,8	3,1				0,379	1,586	1,108	1,108	0,3018	40,2
32	7,0	127,3	7,0				0,380	1,574	1,194	1,174	1,1823	42,6
41	7,6	250,9	14,2				0,374	1,417	1,043	1,023	0,3340	37,1
46	8,2	542,2	30,0				0,379	0,510	0,531	0,511	0,1665	18,5
47	8,3	660,0	36,0				0,377	0,595	0,217	0,175	0,0040	7,2
60	9,4	693,0	38,4				0,377	0,486	0,109	0,089	0,2291	3,2
190	1,0	702,4	38,3				0,370	0,424	0,046	0,329	0,0051	1,0
204	1,0	721,7	40,0				0,374	0,402	0,028	0,308	0,0026	2,5
811	1,12	739,1	40,9				0,374	0,593	0,024	0,004	0,0013	0,15
947	1,15	768,3	42,0				0,370	0,403	0,033	0,013	0,0042	0,5

E₁: Extinktion nach 10 Minuten des Testansatzes
E₂: Extinktion nach 10' nach Zugabe des Standards

STAMM: 638

pH Reaktionsp: 4,5

Rutsche: 10 und
Puffer: B+R 5

Regime: 905 Ende: 1145

25.8.77

1. DURCHFÜHRUNG

ANSAATZ NR.	(1) pH Puffer vor Versuch	(2) pH Rutsche nach Versuch	(3) pH Differenz	(4) pH wobei von Lösung gle	(5) pH wobei von verschieden gle	(6) pH wobei von unterschieden MS	(7) %-gle- Unterschied	(8) Umrechnungs- grad gle zu MS
1	4,0	4,25	+0,25	37,7	2,3	0,48	57	3,9 ✓
2	4,6	4,76	+0,16	37,5	2,5	4,43	6,2	88,6
3	5,2	5,34	+0,14	26,6	13,4	20,5	33,5	76,5
4	5,2	5,37	+0,17	18,1	21,2	20,0	53	70,8
5	6,4	6,42	+0,02	9,1	30,3	40,2	77,2	65
6	7,0	6,90	-0,1	7,0	33,0	42,6	82,5	65
7	7,0	7,36	+0,36	14,2	25,8	7,1	64,5	72
8	8,2	7,86	-0,34	30,0	10,0	18,7	25	92,5
9	8,8	8,34	-0,46	36,0	5,4	7,2	8,5	105,3
10	9,4	8,83	-0,57	38,4	1,6	3,2	4	100
11	10,0	9,10	-0,90	38,3	1,1	1,0	2,7	45,5
12	10,0	9,33	-0,67	40,0	0	0,3	3	
13	11,2	9,75	-1,45	40,5	-0,3	0,45	-2,2	
14	11,8	9,08	-2,72	47,6	-2,6	0,5	-6,5	

Tab. 4: Bestimmungen der verwendeten Glukoselösungen
mit dem Glukosetest

Am 10.8.77: 2,5 ml Ansätze (kleine Warburgansätze)
(wechselnder Glucosegehalt)

Ansatz Nr.	ml Glukoselösung m/25	Aqua dest.	μMol Glukose im Ansatz	gemessene μMol	% Abweichung
1	0,25	2,25	10	10,6	+ 6
2	0,25	2,25	10	10,4	+ 4
3	0,125	2,375	5	4,6	- 8
4	0,05	2,45	2	2,2	+10

Am 21.9.77: 10 ml Ansätze (große Warburgansätze)
(= 40 μMol Glukose)

Ansatz Nr.	gemessene $\mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$	% Abweichung
5	41,8	+4,5
6	39,3	-1,7
7	41,1	+2,7

Am 28.9.77: 10 ml Ansätze (= 40 μMol Glukose)

Ansatz Nr.	gemessene $\mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$	% Abweichung
8	40,4	+1
9	41,2	+4,2
10	42,0	+5
11	40,1	+0,2
12	38,9	-2,7
13	40,7	+1,7
14	39,2	-2,0
15	39,5	-1,2
16	38,9	-2,7
17	40,3	+0,7

Durchschnittliche Abweichung aller 17 Ansätze: $\pm 3,5 \%$

Tab. 5: Vergleich aerobe/anaerobe Inkubation Stamm T3/67

		Inkubation		
		aerob 165'	anaerob 420'	anaerob 165' (2. Durchgang)
pH Optimum Glukose (bei pH...)		8,25	6,65	7,95
Max. Glukoseverbrauch (%)		47	63	100
Glukose- unterhalb pH...		5,05	4,75	4,05
freisetzung oberhalb pH...		9,2	9,7	10,0
Stoffwechselbereich > 50 %		5,7-8,8	5,5-9,0	5,9-9,5
pH-Verschiebung	4,6	+0,05		+0,04
bei Anfangs-pH...	8,2	+0,05		-0,27
	11,2	-0,15		-1,85

Es folgen die pH-abhängigen Aktivitätskurven der ausgewerteten Durchgänge aller untersuchten Stämme.

——— Glucose = GLC

----- Milchsäure = MS

" μ Mol Glc" gibt an, wieviel μ Mol der 40 μ Mol eingebrachten Glc nach der Inkubation enzymatisch nachgewiesen wurden

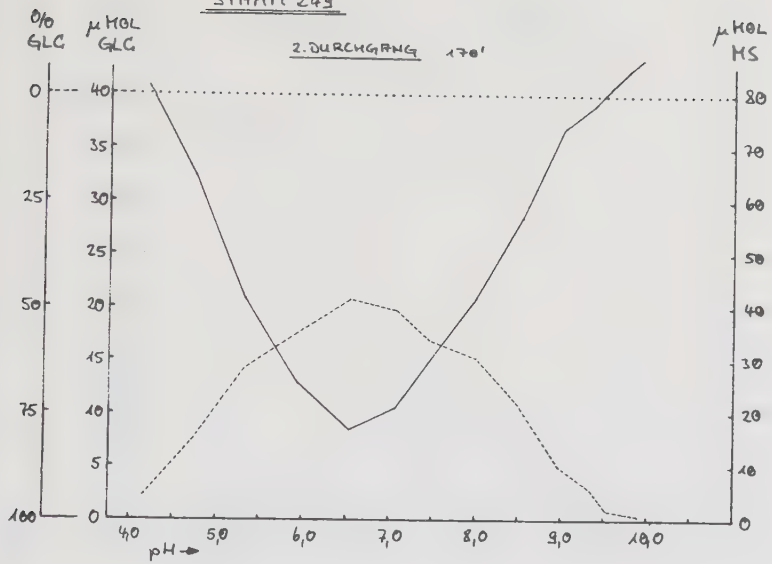
" μ Mol MS" bedeutet, wieviel μ Mol Milchsäure nachweisbar waren

"% Glc" gibt den Prozentsatz an, zu dem die eingesetzte Glucose im Stoffwechsel der Bakterien umgesetzt wurde

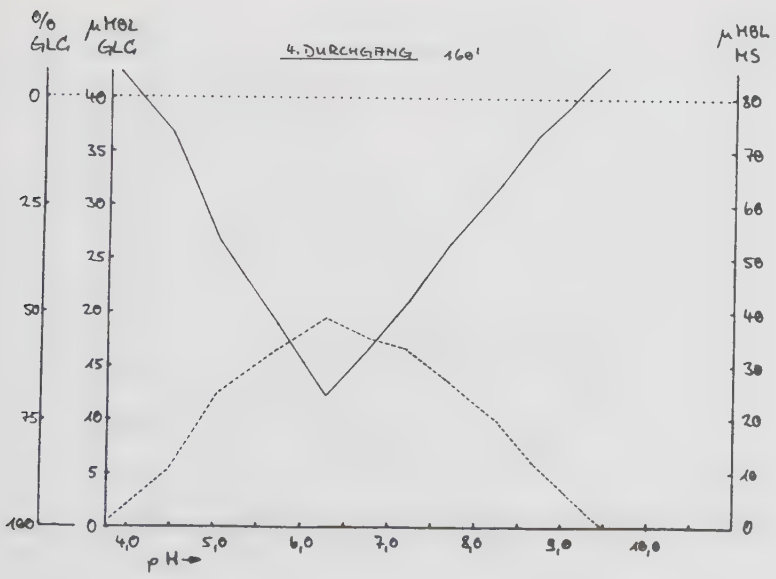
Es liegt jeweils der im Anschluß an die Inkubation nachgemessene pH-Wert zugrunde.

STAMM 249

2. DURCHGANG 170'

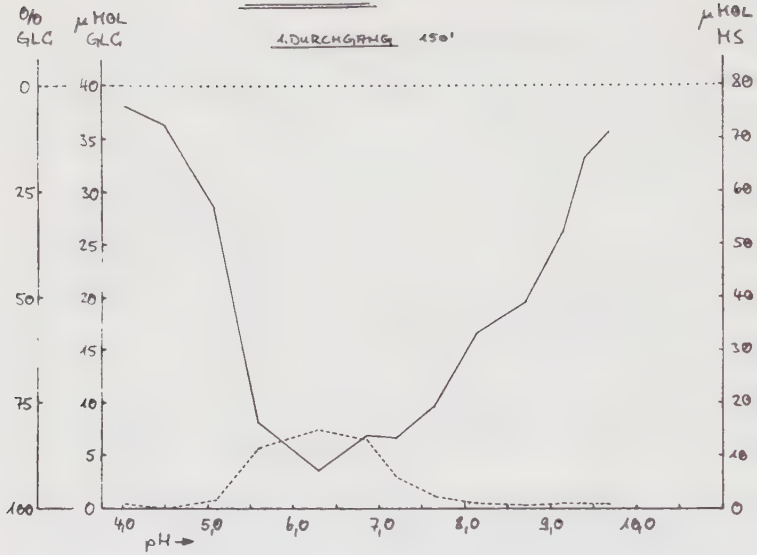


4. DURCHGANG 160'

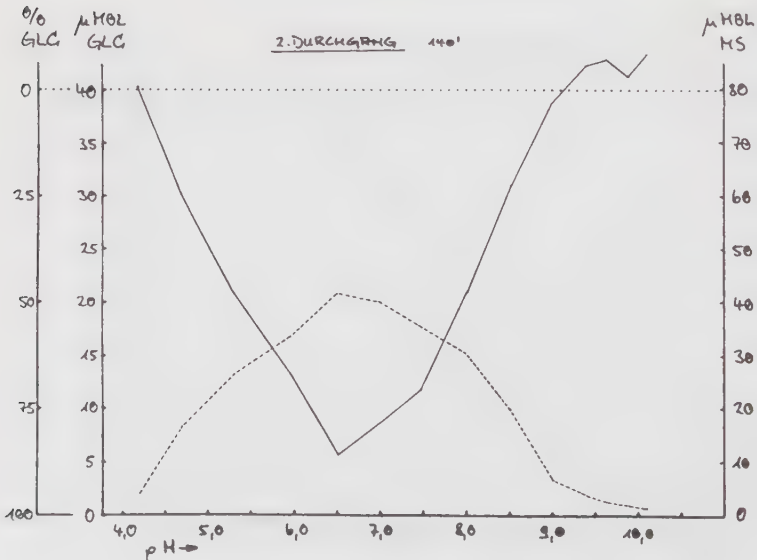


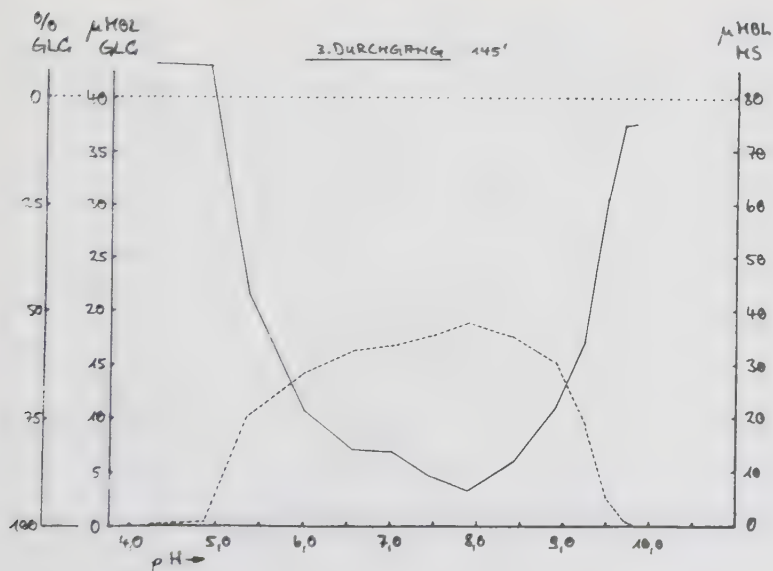
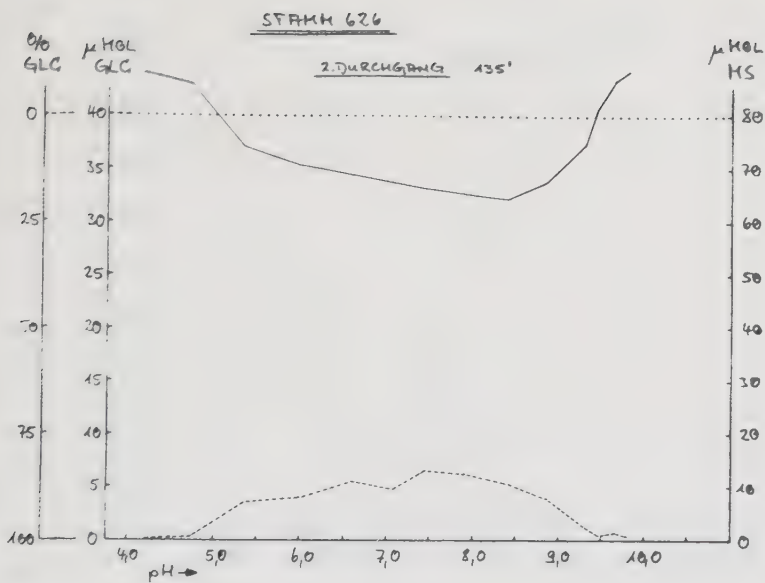
STARK 441

1. DURCHGANG 150'

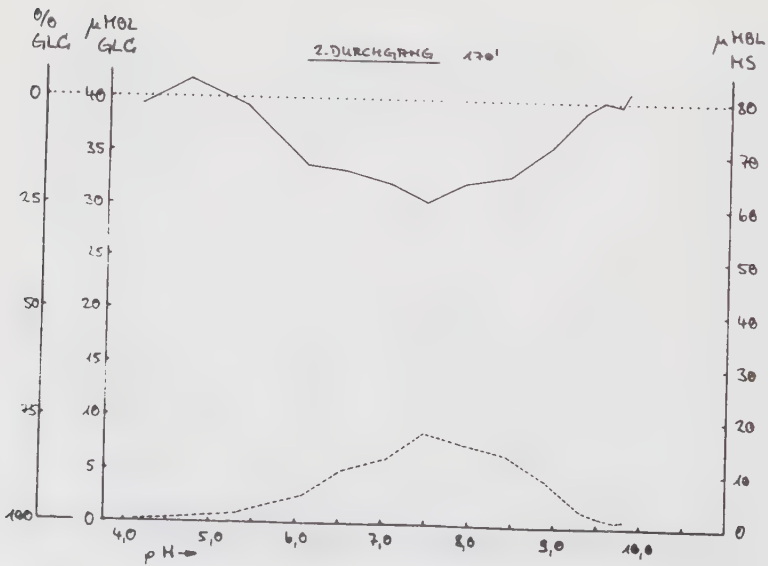
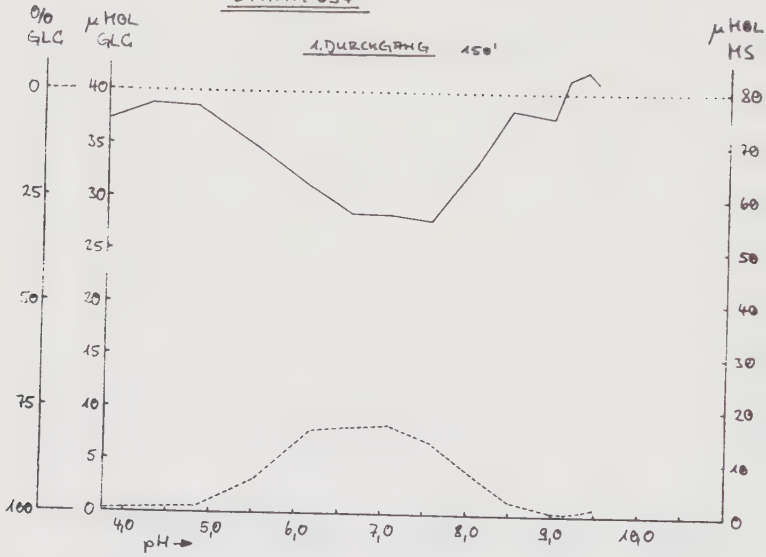


2. DURCHGANG 140'



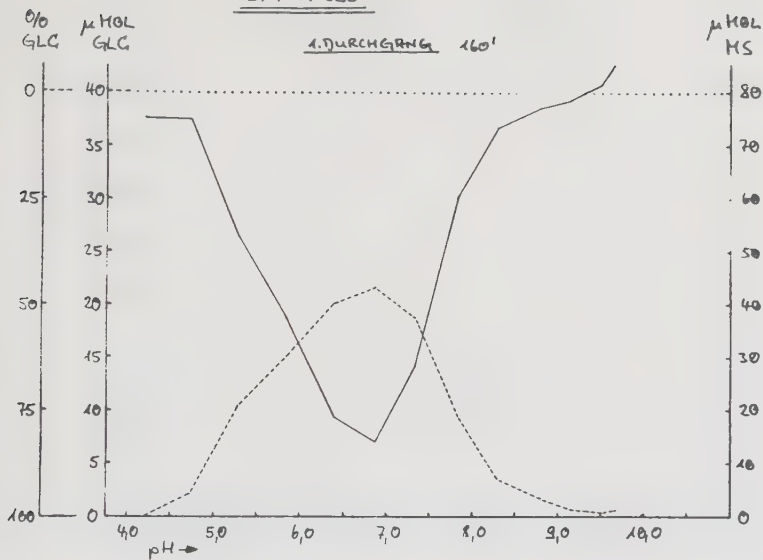


STAMM 634

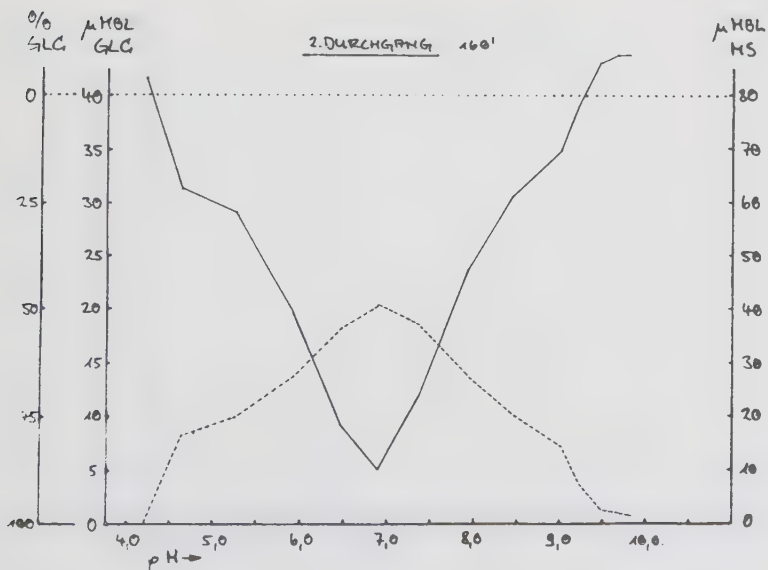


STAMM 638

1. DURCHGANG 160'

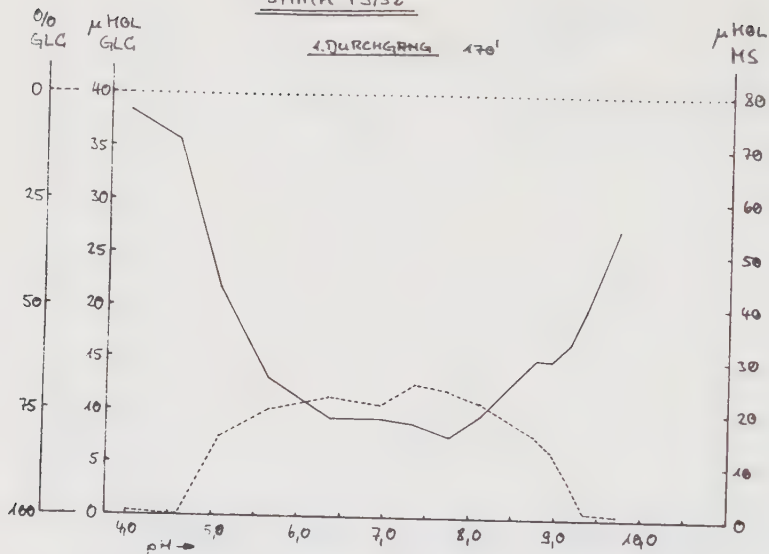


2. DURCHGANG 160'

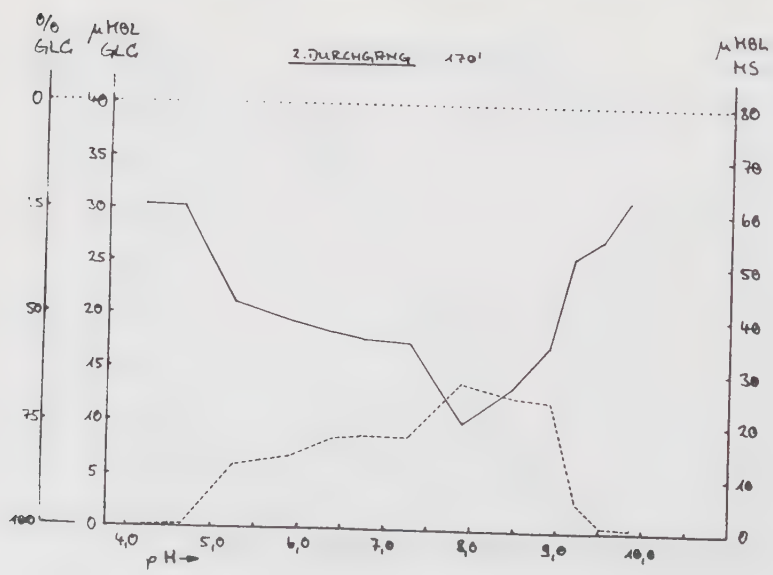


STAMM T3/52

1. DURCHGANG 170'



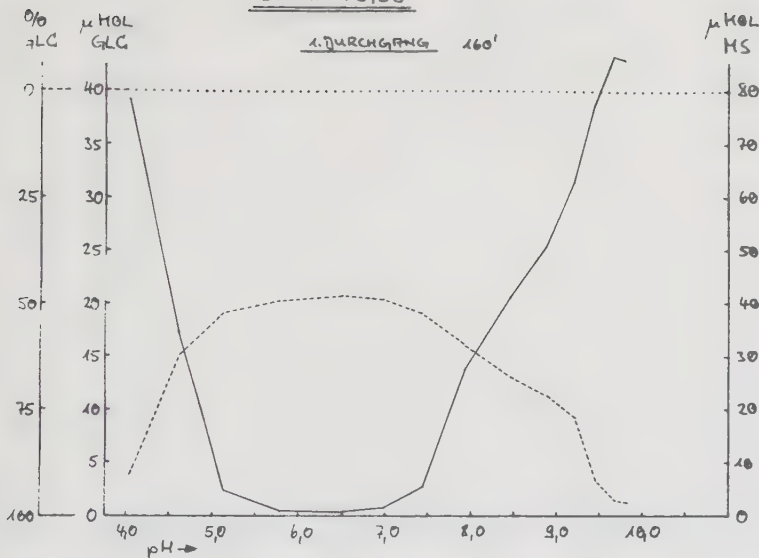
2. DURCHGANG 170'



STAMM T3/53

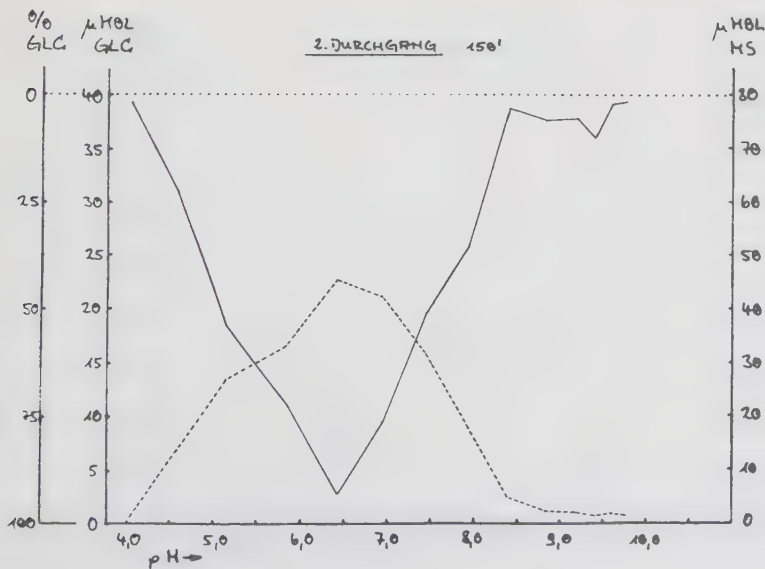
1. DURCHGANG

160'

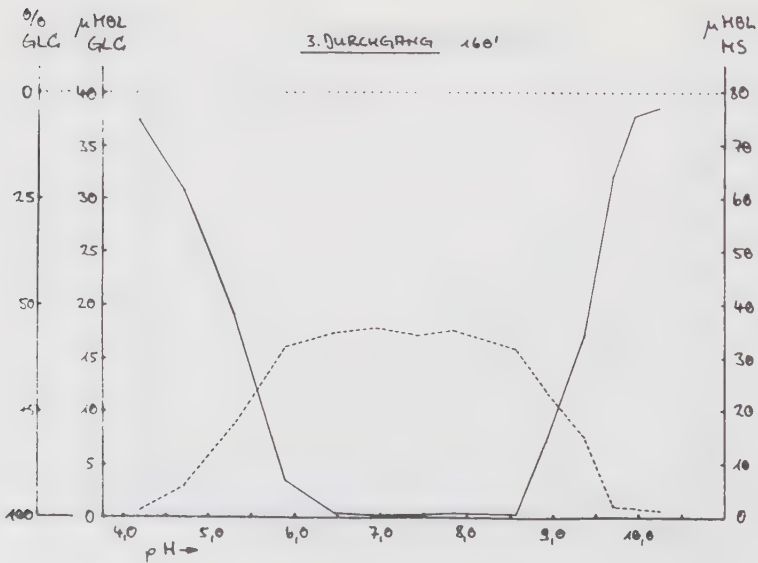
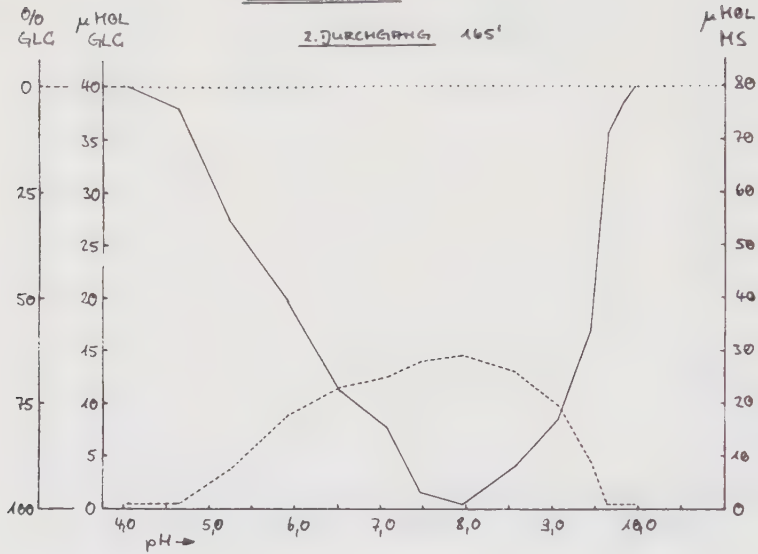


2. DURCHGANG

150'

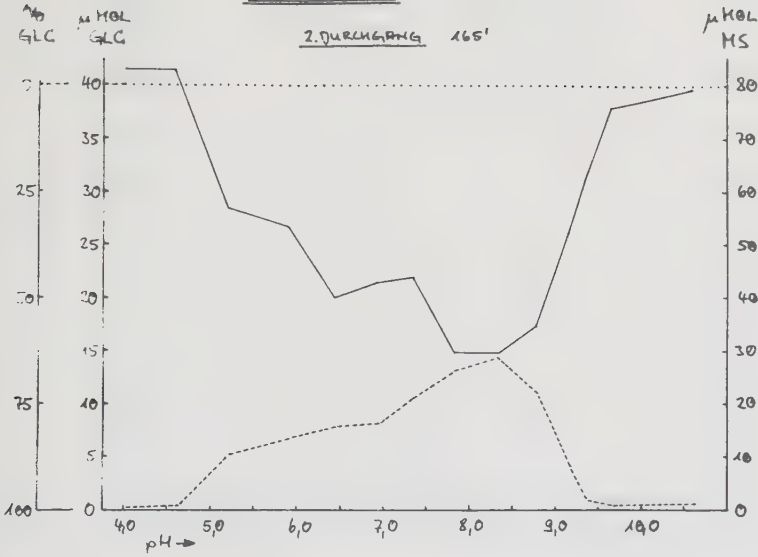


STAHN T3/67

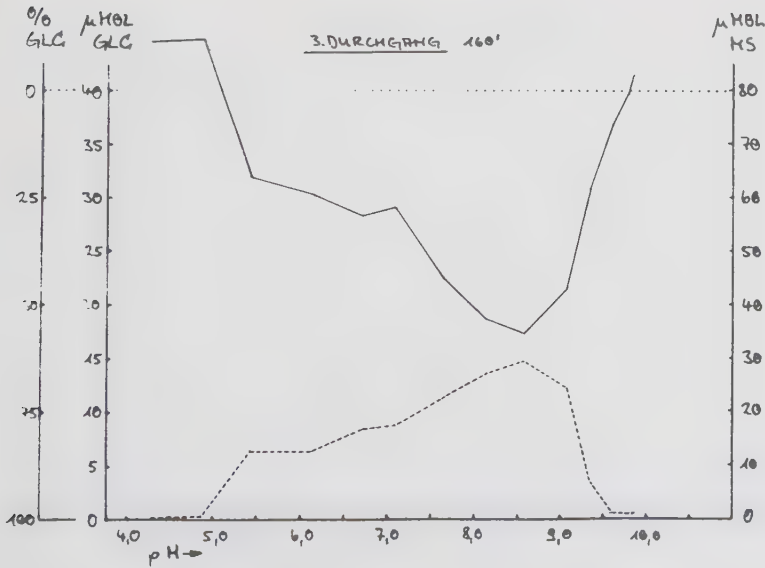


STAMM T5/13

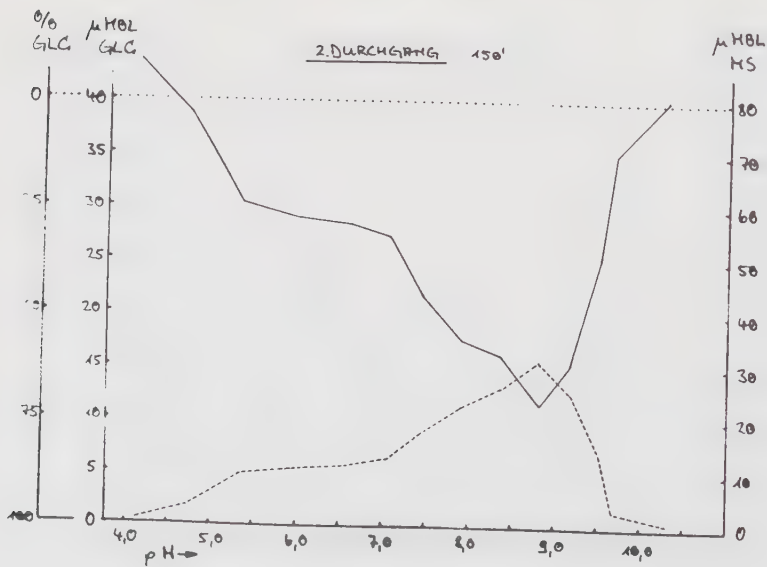
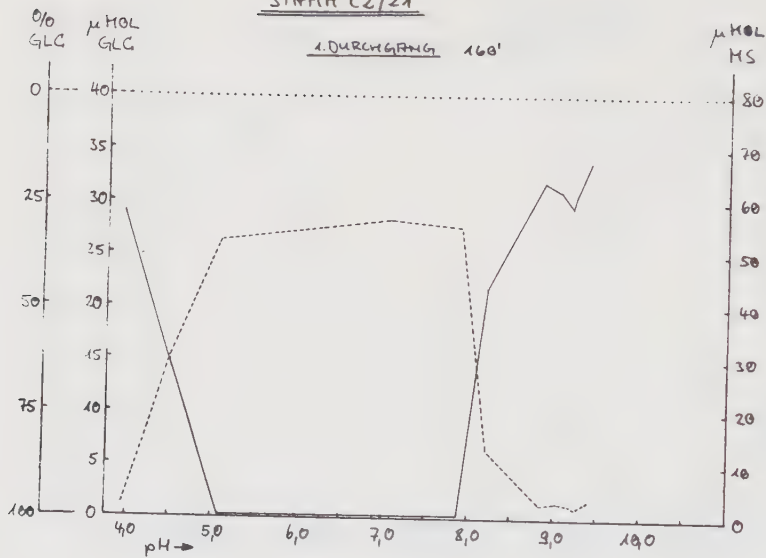
2. DURCHGANG 165'



3. DURCHGANG 160'

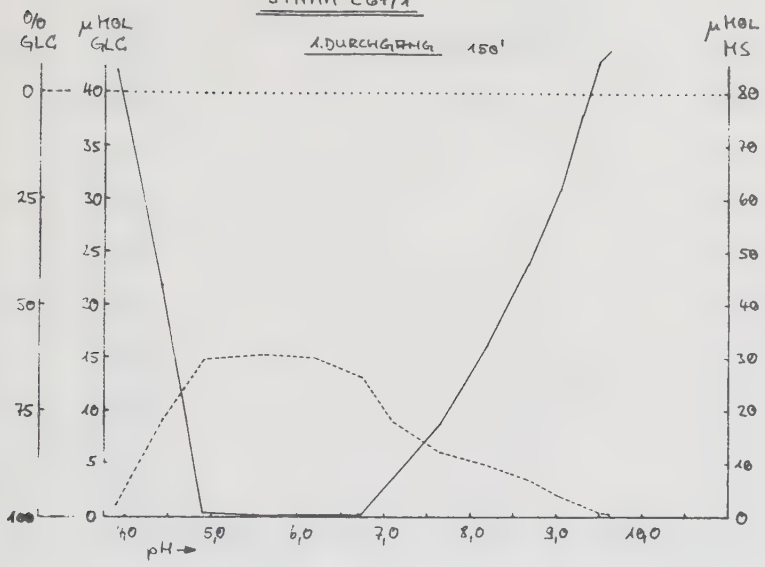


STAMM C2/21

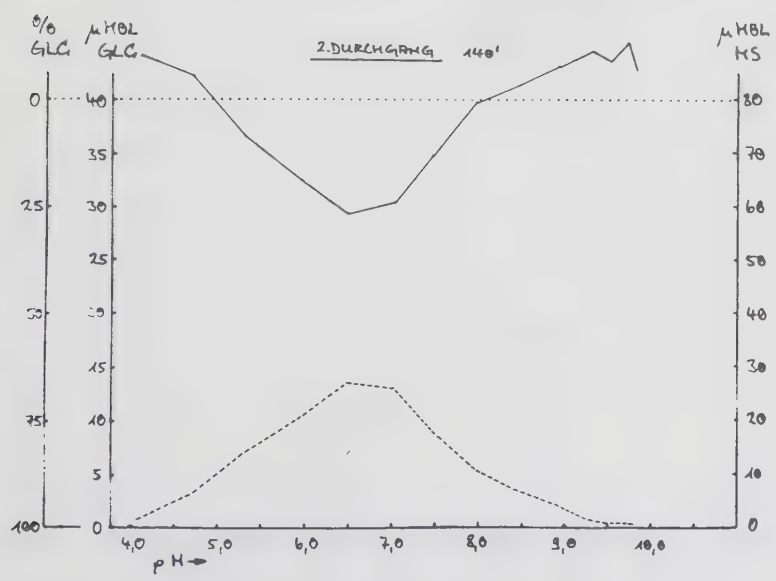


STRHM C67/1

1. DURCHGANG 150'

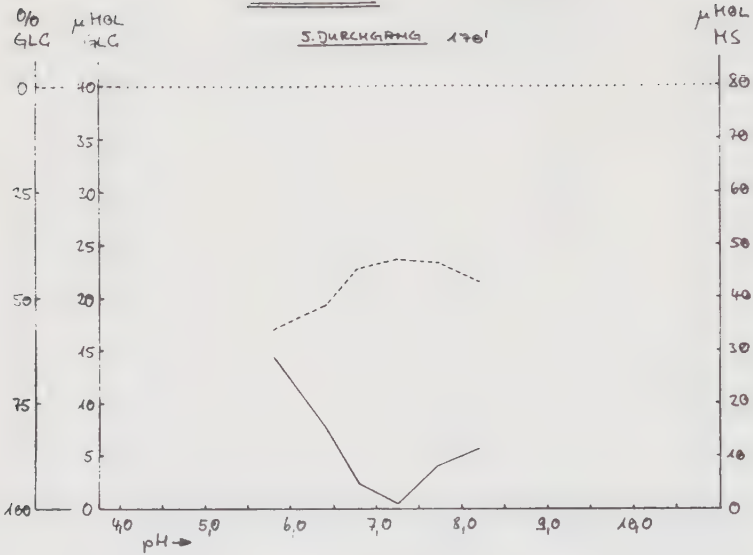


2. DURCHGANG 140'



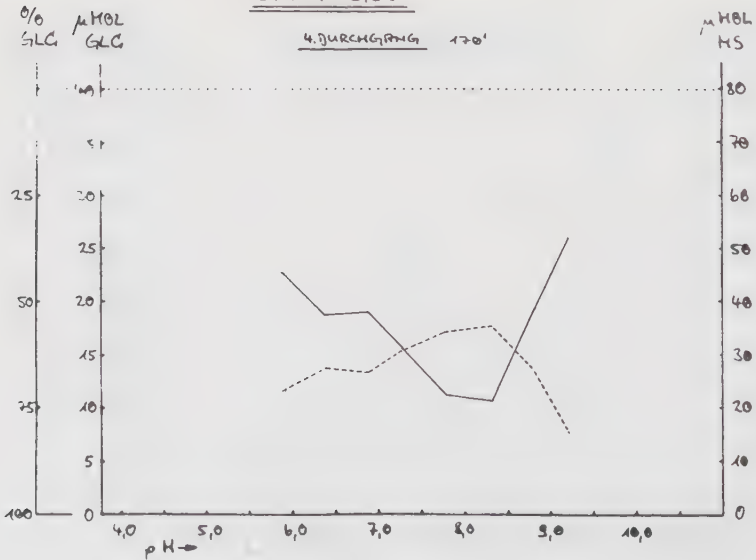
STAMM 634

5. DURCHGANG 170'



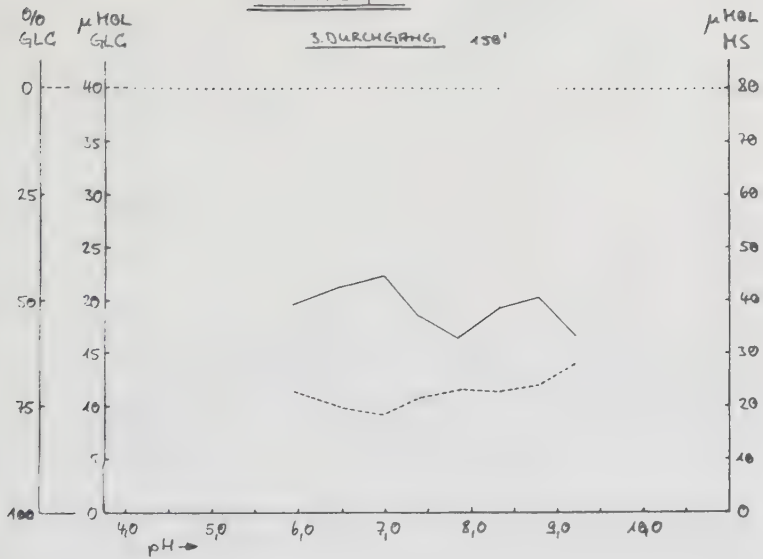
STAMM T3/52

4. DURCHGANG 120'

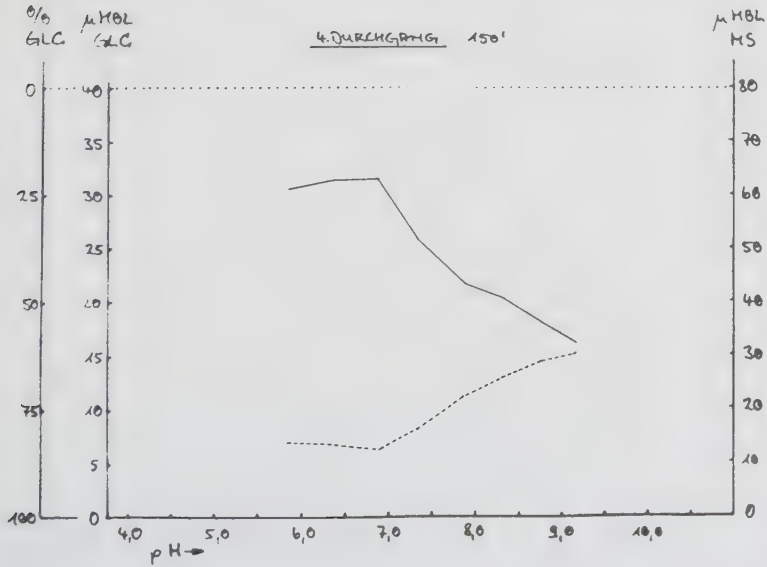


STAMM C2/21

3. DURCHFANG 150'

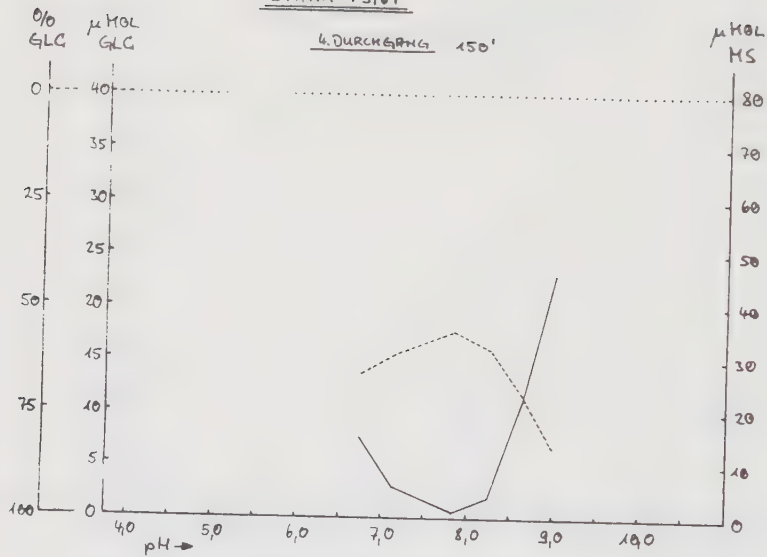


4. DURCHFANG 150'



STAMM T3/67

4. DURCHGANG 150'



Herrn Prof. Dr. Kröncke danke ich für die Überlassung des Themas und die wertvollen Anregungen sowie für die Möglichkeit zur Durchführung der Versuche im biochemischen Labor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie.

Weiterhin habe ich Dank zu sagen Herrn Dr. Distler wie auch Frau Degiorgio, die mich bei der experimentellen Durchführung der Arbeit mit Rat und Tat unterstützten.

LEBENS LAUF

Geboren am 30.9.1950	in Bamberg als 3. Kind des Zahn- arztes Artur Tischer und seiner Ehefrau Lilly
ab September 1956	Besuch der Erlörserschule Bamberg
September 1960	Übertritt in das Franz Ludwig Gym- nasium Bamberg
September 1962	Wechsel an das Deutsche Gymnasium Bamberg (Musisches Gymnasium mit 7-jähriger Form)
28. Juni 1969	Abitur
Juli 1969 bis Dezember 1970	Grundwehrdienst in Bad Reichenhall
ab WS 1973	Zahnmedizinstudium an der Friedrich- Alexander-Universität Erlangen- Nürnberg
dort im August 1974	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
im April 1976	Zahnärztliche Vorprüfung
November 1978	Zahnärztliche Prüfung
seit September 1977	verheiratet mit der Krankengym- nastin Friederike Klein
ab Januar 1979	Assistent in einer zahnärztlichen Praxis bei Bamberg

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197